



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ :

C07K 13/00, C12N 15/31
G01N 33/569, A61K 39/02

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 91/09870**

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

11. Juli 1991 (11.07.91)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/02282

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 1990 (21.12.90)

(30) Prioritätsdaten:
P 39 42 728.5 22. Dezember 1989 (22.12.89) DE
P 40 18 988.0 13. Juni 1990 (13.06.90) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MIKRO-
GEN MOLEKULARBIOLOGISCHE ENTWICK-
LUNGS-GMBH [DE/DE]; Westendstraße 125, D-8000
München 2 (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : FUCHS, Renate [DE/
DE]; Karlstraße 13, D-8024 Deisenhofen (DE). WILS-
KE, Bettina [DE/DE]; Harthausenstraße 8b, D-8000
München 90 (DE). PREAC-MURSIC, Vera [DE/DE];
Rümannstraße 59, D-8000 München 40 (DE). MOTZ,
Manfred [DE/DE]; Schachnerstraße 7, D-8000 München
70 (DE). SOUTSCHEK, Erwin [DE/DE]; Schäfflarn-
straße 126, D-8000 München 70 (DE).

(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Lucile-
Grahn-Straße 22, D-8000 München 80 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE
(europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent),
DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES
(europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB
(europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (eu-
ropäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL
(europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent),
US.

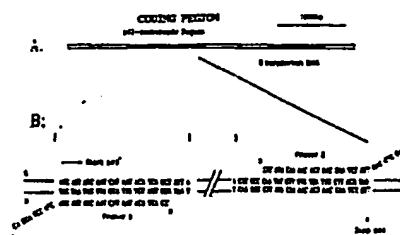
Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelas-
senen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderun-
gen eintreffen.

(54) Title: IMMUNOLOGICALLY ACTIVE PROTEINES FROM BORRELIA BURGDORFERI, RELATED TEST KITS
AND VACCINE

(54) Bezeichnung: IMMUNOLOGISCH AKTIVE PROTEINE VON BORRELIA BURGDORFERI, ZUSAMMENHÄN-
GENDE TESTKITS UND IMPFSTOFF



(57) Abstract

Various immunologically active proteins of *Borrelia burgdorferi* have been prepared in micro-organisms by genetic engineering techniques. To this end, the specific DNA sequences were selected from a *B. burgdorferi* gene bank, using suitable search methods, or represented directly by DNA amplification with selected hybridization samples and placed under the control of inducible promoters such as the lac promoter. By describing efficient purification processes for the anti-gene expressed, the proteins could be made available in a suitable fashion. These proteins can be used to produce specific and sensitive diagnostic test kits. Selective combination of the immunologically active proteins makes accurate diagnosis possible. In addition, monoclonal antibodies are produced which can be used as reagents for the detection of the exciter directly from test samples or after cultivation. The DNA sequences specific to *Borrelia burgdorferi* can be used for the direct detection of the offender in patient samples (e.g. by PCR reaction).

(57) Zusammenfassung Verschiedene immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi* wurden gentechnologisch in Mikroorganismen hergestellt. Dazu wurden die spezifischen DNA-Sequenzen aus einer *B. burgdorferi* Genbank mit geeigneten Suchmethoden selektioniert oder direkt durch DNA-Amplifizierung mit ausgewählten Hybridisierungs-Proben dargestellt und unter die Kontrolle von induzierbaren Promotoren wie etwa dem lac-Promotor gestellt. Durch Beschreibung effizienter Reinigungsverfahren für die exprimierten Antigene konnten die Proteine in geeigneter Weise zur Verfügung gestellt werden. Mit diesen Proteinen können spezifische und sensitive diagnostische Testkits hergestellt werden. Durch die gezielte Kombination der immunologisch aktiven Proteine ist eine präzise Diagnose möglich. Im weiteren wurden monoklonale Antikörper erzeugt, die als Reagenzien für den Erregernachweis direkt aus Untersuchungsproben oder nach Kultivierung Verwendung finden. Die *Borrelia burgdorferi*-spezifischen DNA-Sequenzen sind zum direkten Nachweis des Erregers in Patientenproben einsetzbar (z.B. mittels PCR-Reaktion).

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MN	Mongolei
BE	Belgien	GA	Gabon	MR	Mauritanien
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BJ	Benin	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	PL	Polen
CA	Kanada	IT	Italien	RO	Rumänien
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Sowjet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika

**IMMUNOLOGISCH AKTIVE PROTEINE VON BORRELIA BURGDORFERI,
ZUSAMMENHÄNGENDEN TESTKITS UND IMPSTOFF**

Die Lyme-Borreliose ist in der Bundesrepublik Deutschland die häufigste von Zecken übertragene Infektionskrankheit des Menschen. Im Gegensatz zur Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME), die ebenfalls durch Zecken übertragen wird, beschränkt sich die Lyme-Borreliose nicht auf wenige Endemiegebiete, sondern kommt in allen Ländern der BRD vor. Die Durchseuchung des Hauptvektors in Europa, *Ixodes ricinus*, mit dem Erreger der Lyme-Borreliose, der Spirochäte *Borrelia burgdorferi*, liegt im süddeutschen Raum bei ca. 20 % der Adulten, ca. 10 % der Nymphen und bei ca. 1 % der

Larven. Der Hauptvektor in USA, *Ixodes dammini*, kann in Hochendemiegebieten bis zu 100 % mit Borrelien befallen sein.

B. burgdorferi gehört zur Familie der Spirochäten. Spirochäten sind schraubenförmige Bakterien von 8-30 µm Länge. Sie bestehen aus einer äußeren Hülle, den Endoflagellen im Periplasma und dem Protoplasmazyylinder. Der Protoplasmazyylinder ist ein Komplex aus Cytoplasma, innerer Zellmembran und Peptidoglykan. Zu den human-pathogenen Vertretern der Spirochäten gehören neben *B. burgdorferi* die Rückfallfieberborrelien (z.B. *B. recurrentis*), der Erreger der Syphilis (*Treponema* (T.) *pallidum*) und die Leptospiren. Auf Grund der nahen immunologischen Verwandtschaft der Erreger sind Kreuzreaktionen ein Problem beim serologischen Nachweis von Antikörpern bei Syphilis und Lyme-Borreliose mit bisher verfügbaren Testen.

Eine Infektion mit *B. burgdorferi* führt zu einem komplexen Krankheitsbild, das man ähnlich wie bei der Syphilis, in drei verschiedene Stadien einteilen kann. Die wichtigsten Manifestationen sind:

Frühphase: Stadium I	Erythema migrans lymphozytäre Meningoradikulitis Bannwarth (LMR) Borrelien-Lymphozytom
Spätphase: Stadium III	Lymearthritis Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) chronische Borrelien-Encephalomyelitis

Seltenere klinische Manifestationen sind: Karditis, Myositis, Iritis und Panophthalmitis. Die diaplacentare Übertragung des Erregers ist möglich, jedoch sind bisher nur wenige Fälle einer connatalen Lyme Borreliose dokumentiert. Die verschiedenen Stadien können einzeln oder kombiniert auftreten. Die Infektion mit *B. burgdorferi* kann auch subklinisch verlaufen. Epidemiologische Studien an 375 klinisch nachgewiesenen Fällen zeigten einige Besonderheiten in der Alters- und Geschlechtsverteilung bei den verschiedenen klinischen Manifestationen. So fanden sich Patienten mit Erythema migrans am häufigsten in der Altersgruppe der 30- bis 60-jährigen. Neurologische Manifestationen zeigten zwei Altersgipfel: den ersten bei Kindern und Jugendlichen bis 20 Jahren, den zweiten bei 40- bis 70-jährigen. Die Lyme-Arthritis wurde am häufigsten bei 30- bis 60-jährigen beobachtet. Patienten mit ACA waren in keinem Falle jünger als 30 Jahre. Die ACA betrifft deutlich häufiger Frauen als Männer. Die serologische Untersuchung zeigte im Immunfluoreszenztest bei Patienten mit Erythema migrans überwiegend positive IgM-Befunde, bei neurologischen Manifestationen überwiegend positive IgG-Befunde. Bei den Spätmanifestationen ACA und Lyme-Arthritis waren die IgG-Titer regelmäßig erhöht und IgM-Antikörper nur mehr in Ausnahmefällen nachweisbar.

Für die Diagnostik steht sowohl der Erregernachweis als auch der Antikörpernachweis zur Verfügung. Der Erregernachweis aus Patientenmaterial (Hautbiopsien, Liquor, Punkttate) ist besonders im Frühstadium (Erythema migrans), bei dem ein Antikörpernachweis häufig negativ

ist, zu empfehlen. Allerdings ist zur Anzüchtung von *B. burgdorferi* ein komplexes Nährmedium nötig (Preac-Mursic, V.; Wilske; B.; Schierz, G. (1986): European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks - culture conditions and antibiotic susceptibility. Zbl.Bakt.Hyg.A 163, 112-118) und die Kultivierung ist daher Speziallabors vorbehalten. Für die Isolierung des Erregers wird außerdem eine Zeit bis zu 5 Wochen benötigt. Die Isolierung von *B. burgdorferi* gelingt aus Hautproben in 50-70 % der Fälle mit Hautmanifestationen und in 3-5 % der Fälle mit Neuroborreliose (Preac-Mursic, V.; unpubl. Ergebnisse).

Der Antikörnernachweis (IgM, IgG) wird im Serum und bei neurologischen Manifestationen auch aus Liquor durchgeführt. Der serologische Befund ist abhängig vom Stadium der Erkrankung, der Dauer der Symptome und einer evt. schon erfolgten Antibiotika-Therapie. So ist der Antikörnernachweis mit bisher verfügbaren Testen beim Erythema migrans nur in 20-50 % der Fälle erfolgreich, bei neurologischen Manifestationen in 50-90 % und bei ACA und Arthritis in 90-100 %.

Die Therapie der Lyme-Borreliose wird überwiegend mit Penicillin G, Tetracyclinen, Erythromycin oder Cephalosporinen durchgeführt. Die Lyme-Borreliose heilt zwar in den frühen Stadien oft spontan aus, allerdings sind auch dann Spät-

manifestationen nicht ausgeschlossen. Daher ist eine Therapie im Frühstadium unerlässlich. Zudem ist eine klinische Heilung nach Antibiotikatherapie bei Spätmanifestationen nur in einem Teil der Fälle zu erzielen (z.B. nur ca. 50 % bei Lyme-Arthritis).

Daher sollte die Lyme Borreliose möglichst frühzeitig diagnostiziert werden. Da (wie bereits erläutert) die Erregerisolierung teuer, zeitaufwendig und zudem auch nicht immer erfolgreich ist, sollten bessere serodiagnostische Tests entwickelt werden. Die bisher benutzten Verfahren (Immunfluoreszenztest (IFT), indirekter Hämagglutinationstest (IHA), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versagen oftmals in den Frühstadien. Als Antigene werden für diese Tests ganze *B. burgdorferi* Zellen oder Gesamtzell-Ultrasonikate eingesetzt. Die Verwendung unterschiedlicher *B. burgdorferi* Stämmen als Antigen führt im Ultrasonikat-ELISA zu unterschiedlichen Testergebnissen. Die Zellen werden auf Objektträger bzw. Ultrasonikat-Antigen auf Mikrotiterplatten fixiert, mit Serum oder Liquor inkubiert und die Borrelien-spezifischen Antikörper mit einem zweiten Fluoreszenz- oder Peroxidase-markierten Antikörper der entsprechenden Immunglobulinklasse detektiert. Die Reaktion wird dann entweder im Fluoreszenzmikroskop (IFT) oder nach einer Farbreaktion im Photometer (ELISA) ausgewertet.

Ein Problem für die Spezifität der Tests sind breite Kreuzreaktionen des Erregers *B. burgdorferi* zu anderen bakteriellen Erregern, insbesondere zu *T. pallidum*, dem Erreger der Syphilis. Da die Testantigene im allgemeinen aus Lysaten des gesamten Erregers bestehen, werden auch Antikörper gegen sog. "common antigens" erfaßt (Hansen, K.; Hinderesson, P.; Pedersen, N.S. (1988): Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum

improves serodiagnosis in Lyme disease. J.Clin.Microbiol., 26, 338-346). "Common antigens" sind weit verbreitete und in ihrer Sequenz stark konservierte Proteine, d.h. die "Common antigens" von Borrelien, Treponemen, aber auch zahlreicher anderer Bakterien besitzen gemeinsame Epitope. Daneben könne falsch positive Reaktionen im IgM-IFT oder IgM-ELISA bei Seren mit Rheumafaktor-Aktivität auftreten. Um die Testspezifischer zu machen, wird daher beim Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern eine Prae-Absorption der Seren mit einem Treponema-Ultrasonikat und zusätzlich beim Nachweis von IgM-Antikörpern noch eine Absorption mit Rheumafaktorabsorbens durchgeführt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi* zur Verfügung zu stellen, die in einem Testkit Verwendung finden, das die oben erwähnten Nachteile nicht aufweist. Weiterhin soll dieses Testkit den schnellen und zuverlässigen Nachweis von gegen *Borrelia burgdorferi* gerichteten Antikörpern ermöglichen.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die gegen bestimmte immunologisch aktive Proteine von *Borrelia burgdorferi* gerichtet sind. Darüber hinaus sollen immunologisch aktive Proteine zur Verfügung gestellt werden, die sich als Impfstoffe gegen durch Borrelien-Stämme verursachte Infektionen eignen.

Bei der Untersuchung von Patientenserum aus unterschiedlichen Krankheitsstadien der Lyme-Borreliose im Western Blot sowie der Untersuchung von Nicht-Lyme-Borreliose-Patienten (insbesondere Syphilis-Patienten) auf Kreuzreaktivität mit *B. burgdorferi* wurden immunologisch aktive Proteine (*B. burgdorferi*-Antigene) gefunden, die einerseits eine gute Antikörper-Antwort nach Infektion hervorrufen und zum anderen eine geringe Kreuzreaktivität mit nicht

B. burgdorferi-positiven Seren zeigen (Beispiel 1). Es zeigte sich, daß ein bestimmter Stamm von B. burgdorferi mit der laborinternen Kennzeichnung PKO der bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) unter der Nr. 5662 hinterlegt wurde, unter anderem ein immundominantes Protein im Molekulargewichtsbereich um etwa 22 kD (pC-Protein) besitzt. Die Bestimmung des Molekulargewichts der erfindungsgemäßen Proteine erfolgte nach an sich bekannten Methoden insbesondere durch SDS-Gelelektrophorese. Es wurde gefunden, daß dieses Protein immundominant für die IgM-Antwort ist. Dieses Protein ist nicht in allen B. burgdorferi-Stämmen in gleicher Weise ausgeprägt. Erfindungsgemäß wurde dieses immunologisch aktive Protein (pC-Protein) gentechnologisch hergestellt (Beisp. 3).

Auch andere immunologisch aktive Proteine (Antigene), die sich in besonderer Weise für die Verwendung in Testkits eignen, wurden in allgemein zugänglichen und kommerziell erhältlichen Escherichia coli-Zellen, wie beispielsweise den Stämmen JM 105 (Pharmacia) oder DH 5 (Gibco-BRL) hergestellt. Hierzu wurden die für diese Proteine kodierenden B. burgdorferi DNA-Fragmente isoliert und anschließend in effektive Expressionsvektoren eingesetzt (Beisp. 2 und 3).

Die Identifizierung und Isolierung der entsprechenden DNA-Fragmente erfolgte nach verschiedenen Methoden. So wurde ein immunologisch aktives Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 41 kD, das im folgenden auch als p41-Protein bezeichnet wird, mittels Polymerase chain reaction (PCR) und spezifischen Primern, deren Sequenzen synthetisch hergestellt wurden, dargestellt (Beisp. 2).

Weiterhin wurde eine Genbank des B. burgdorferi-Genoms erstellt, die mittels monoklonaler Antikörper auf die direkte Expression von immunologisch aktiven Proteinen durchsucht wurde.

In entsprechender Weise wurden auch Proteine mit Molekulargewichten von etwa 100 kD und 31 kD kloniert und sequenziert.

Eine weitere Methode bestand darin, bestimmte ausgewählte immunologisch aktive Proteine (Antigene) aus *B. burgdorferi*-Lysaten zu reinigen und Aminosäuresequenzen dieser Antigene zu ermitteln. Anschließend wurden der Aminosäuresequenz entsprechende Oligodesoxynukleotide synthetisiert und durch Hybridisierung diejenigen Klone der Genbank identifiziert, die für die immunologisch aktiven Proteine kodierende DNA-Sequenzen aufwiesen. Die beiden letztgenannten Methoden werden im Beispiel 3 näher erläutert.

Nach Charakterisierung, Sequenzierung und Umklonierung der Gene in entsprechende Expressionsvektoren wurden die Antigene in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend gereinigt. Ein bevorzugtes Reinigungsverfahren wird in Beispiel 4 beschrieben.

Die erfindungsgemäß hergestellten immunologisch aktiven Proteine von *Borrelia burgdorferi* können in Testkits verwendet werden, die einen überraschend sensitiven Nachweis von Antikörpern gegen *B. burgdorferi* in verschiedenen Untersuchungsflüssigkeiten zur Verfügung stellen. Ein Vorteil der erfindungsgemäß hergestellten immunologisch aktiven Proteine besteht darin, daß die Präparationen nur aus dem gewünschten Protein und möglicherweise solchen Proteinen bestehen, die auf Degradationserscheinungen und/oder unvollständige Translation zurückzuführen sind. Diese Präparationen enthalten keine solchen *B. burgdorferi*-Proteine, die nicht dem rekombinant erzeugten Protein entsprechen, da sie gentechnologisch hergestellt wurden.

Unter dem Begriff "Testkits" wird ein Satz von Testreagentien verstanden, der den Nachweis von bestimmten Antikörpern ermöglicht. Die den Testkits zugrundeliegenden Prinzipien wurden in "Immunoassays for the 80s" (1981) von A. Voller et al., erschienen bei MTP Press Ltd, Falcon House, Lancaster, England beschrieben. Die Testreagentien weisen als wichtigste Komponente das oder die Antigen(e) und gegebenenfalls spezifische, vorzugsweise monoklonale Antikörper auf.

Die erfindungsgemäßen Testkits zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sind dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens ein immunologisch aktives Protein enthalten, das ohne Verunreinigung durch andere Proteine aus dem *Borrelia burgdorferi* Stamm zur Verfügung steht. Dieses immunologisch aktive Protein wirkt als Antigen und reagiert mit den in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen Antikörpern. Vorzugsweise weisen die erfindungsgemäßen Testkits zwei bis vier immunologisch aktive Proteine auf, die ohne Verunreinigung durch andere Proteine aus *B. burgdorferi* zur Verfügung stehen. Weiterhin enthält das Testkit eine Anzeigekomponente, die das Vorhandensein von Komplexen aus Antigen und Antikörper ermöglicht.

Die erfindungsgemäßen Testkits können auf verschiedenen, an sich bekannten Prinzipien beruhen. Grundsätzlich kann das Antigen eine Markierung tragen, wobei die Markierung aus einem radioaktiven Isotop oder einem Enzym bestehen kann, das eine Farbreaktion katalysiert. Ebenso kann das Antigen an eine feste Unterlage (Mikrotiterplatten oder Kügelchen) gebunden sein und die Anzeigekomponente kann in einem gegen Antikörper gerichteten Antikörper bestehen, der eine Markierung trägt, wobei die Markierung in einem radioaktiven Isotop oder einem Enzym bestehen kann, das eine Farbreaktion katalysiert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird als Testkit der sogenannte ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) bevorzugt. Eine Ausführungsform davon wird in Beispiel 5 näher

beschrieben. Die Ergebnisse dieses Beispiels zeigen, daß überraschenderweise durch den Einsatz nur eines erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Proteins eine sehr hohe Spezifität des Testkits erreicht werden konnte. Darüber hinaus ermöglichen die erfindungsgemäßen Testkits überraschenderweise eine mit dem Krankheitsstadium korrelierte Differenzierung. Der kombinierte Einsatz von mehreren Antigenen in einem Testkit ermöglicht den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* auch in solchen Fällen, in denen sich die Krankheitssymptome noch nicht klinisch manifestiert haben. Ebenso können Infektionen mit *B. burgdorferi* diagnostiziert werden, bei denen der Patient nur eine subklinische Infektion durchläuft. Die Aussage, die durch die erfindungsgemäßen Testkits erhalten werden kann, ist insbesondere in den Fällen bedeutsam, in denen ein Zeckenbiß festgestellt werden konnte, jedoch nicht klar ist, ob eine Infektion mit einem Borrelien-Stamm vorliegt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der kombinierte Einsatz von mehreren der immunologisch aktiven Proteine bevorzugt. Ganz besonders bevorzugt ist eine Kombination der Proteine p41, pC, p17 und/oder p100. Durch die Verwendung der erfindungsgemäß bevorzugten ELISA-Testkits kann auch eine Differenzierung hinsichtlich der Natur der Antikörper erfolgen. Sollen beispielsweise IgM-Antikörper nachgewiesen werden kann der sogenannte μ -capture-assay angewendet werden, dabei werden gegen IgM-Antikörper gerichtete Antikörper an die feste Phase gebunden. Nach Inkubation der Testplatten mit der zu untersuchenden Flüssigkeit werden die in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen IgM-Antikörper an die feste Phase gebunden. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen kann dann ein immunologisch aktives Protein der vorliegenden Erfindung zugegeben werden. Dieses Antigen wird dann durch ein Anzeigemolekül nachgewiesen. Hierbei kann das Antigen biotinyliert sein, wobei anschließend Avidin zugegeben wird, das kovalent gebundene Peroxydase aufweist. Die Peroxydase katalysiert dann eine Reaktion, die zur Farbbildung führt.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß solche monoklonalen Antikörper zu dem Komplex Träger/anti-IgM-Antikörper/nachzuweisender Antikörper/erfindungsgemäßes Antigen gegeben werden, die spezifisch für das Antigen sind und biotinyliert sind. Die Biotinylierung ist beispielsweise in Monoklonale Antikörper (1985) Springer Verlag, J.H. Peters et al. beschrieben. Der Nachweis des Komplexes erfolgt darin durch Zugabe von Avidin, an das ein eine Farbreaktion katalysierendes Enzym gekoppelt ist.

Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß der IgM-Nachweis durch indirekten ELISA geführt wird. Dabei werden die erfindungsgemäßen Antigene auf Mikrotiterplatten gebunden, mit der zu untersuchenden Flüssigkeit inkubiert und nach Waschen erfolgt der Nachweis der Immunkomplexe mittels anti-p-Konjugat.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Erzeugung von monoklonalen Antikörpern, die gegen die immunologisch aktiven Proteine von *Borrelia burgdorferi* gerichtet sind. Die Herstellung derartiger monoklonaler Antikörper ist in Beispiel 6 näher erläutert. Verwendet werden können derartige monoklonale Antikörper als Reagenzien für den direkten Erregernachweis. Es können aber auch monoklonale Antikörper an die feste Phase einer Mikrotiterplatte gekoppelt werden. Nach Zugabe der immunologisch aktiven Proteine (Antigene) werden diese durch Antikörper-Antigen-Bindung an die Mikrotiterplatte fixiert. Anschließend wird die Untersuchungsflüssigkeit (bei der es sich beispielsweise um Serum oder Liquor handeln kann) zugegeben. Die in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen Antikörper binden sich dann an das Antigen und lassen sich mit Hilfe einer Anzeigekomponente nachweisen.

Darüber hinaus lassen sich die monoklonalen Antikörper sehr gut zur Reinigung der immunologisch aktiven Proteine (Antigene) verwenden. Vorteilhaft hierbei ist, daß die Reinigung besonders schonend ist. Hierzu werden die monoklonalen Antikörper an eine feste Matrix gebunden. Vorzugsweise liegt diese feste Matrix in Form einer Säule vor. Anschließend werden die partiell vorgereinigten Antigene bei physiologischen Bedingungen mit den an eine feste Matrix gekoppelten Antikörpern versetzt. Nach Waschen des Matrix-Antikörper-Antigen-Komplexes können die Antigene eluiert werden. Üblicherweise werden hierzu hohe Salzkonzentrationen oder Puffer mit einem solchen pH-Wert verwendet, der die Elution ermöglicht.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden DNA-Sequenzen zur Verfügung gestellt, die der Aminosäuresequenz der immunologisch aktiven Proteine ganz oder zum Teil entsprechen. Diese DNA-Sequenzen können bevorzugt zum Nachweis von Borrelien-Stämmen im Untersuchungsmaterial durch Hybridisierung verwendet werden. Dazu wird ein Oligonukleotid hergestellt, das der DNA-Sequenz zum Teil entspricht. Dieses Oligonukleotid wird radioaktiv markiert. Andererseits wird die DNA aus dem Untersuchungsmaterial an einen geeigneten Filter, vorzugsweise Nitrocellulose gebunden und anschließend mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid hybridisiert. Ebenso können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen für die in-situ Hybridisierung zum direkten Nachweis von *B. burgdorferi* in infiziertem Gewebe verwendet werden. Anstelle der chemisch synthetisierten Oligonukleotide können auch entsprechende DNA-Fragmente in Bakterien vermehrt werden und anschließend aus den Vektoren mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten werden. Nach Isolierung dieser DNA-Fragmente können diese radioaktiv markiert werden und wie oben beschrieben zur Hybridisierung verwendet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Proteine (Antigene) von *Borrelia burgdorferi* als Impfstoffe verwendet werden können. Dazu werden die erfindungsgemäßen Antigene in reiner Form dargestellt. Anschließend werden

sie einzeln oder in Kombination mit oder ohne ein die Immun-Antwort-stimulierendes Agens der zu impfenden Person appliziert. Hierdurch wird die Bildung von Antikörpern angeregt, die spezifisch gegen *Borrelia burgdorferi*-Stämme sind.

Die erfindungsgemäßen Proteine, DNA-Sequenzen und monoklonalen Antikörper können in verschiedenen Bereichen Verwendung finden. So können die erfindungsgemäßen Testkits auch zum Nachweis von *B. burgdorferi*-Infektionen bei Tieren verwendet werden und die Proteine können auch zur Impfung von Tieren, insbesondere von wertvollen Tieren, verwendet werden.

Soweit die vorliegende Erfindung Proteine von *Borrelia burgdorferi* betrifft kann es sich auch um Proteinfragmente handeln, die lediglich eine Teilsequenz der vollständigen Aminosäuresequenz aufweisen. Derartige Teilsequenzen weisen regelmäßig wenigstens 10 Aminosäuren und bevorzugt wenigstens 15 Aminosäuren auf.

Üblicherweise sind jedoch die Proteinfragmente größer. So wurde beispielsweise bei dem Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 41 kD festgestellt, daß eine Deletion am N-Terminus des Proteins um etwa 20 bis 25 Aminosäuren zu einem Protein führt, das eine erhöhte Spezifität aufweist. Grund dafür könnte sein, daß ein sogenanntes "common epitop" deletiert wird und spezifische Epitope verbleiben. Die Verwendung von derartig deletierten Proteinen ist dabei besonders bevorzugt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kD bzw. 100 kD besonders bevorzugt. Diese Proteine können auch von anderen *Borrelia burgdorferi* Stämmen abstammen.

Anhand der folgenden Tabellen, Abbildungen und Beispiele werden die bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung näher erläutert.

Beispiel 1:**Bestimmung der immunrelevanten und Genus-spezifischen Borrelienproteine**

Es wurde nach spezifischen, häufig auftretenden Serum-Antikörpern gesucht, die gegen bestimmte einzelne *B. burgdorferi* Antigene gerichtet sind, möglichst wenig Kreuzreaktivität mit Proteinen verwandter Erreger zeigen und zusätzlich auch eine Korrelation mit den einzelnen Lyme-Borreliose-Krankheitsstadien zulassen.

Die Suche nach häufig erkannten Antigenen erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurde ein Bakterienextrakt von *B. burgdorferi* (Stamm PKo) (Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Schierz, G. (1986): *European Borreliae burgdorferi* isolated from humans and ticks - culture conditions and antibiotic susceptibility. Zbl. Bakt. Hyg. A 163, 112-118) nach Pelletieren, Resuspendieren in PBS/NaCl und Ultraschallbehandeln im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685)

Die Gele bestanden aus einem Sammelgel mit Taschen für die Proben und einem Trenngel. Die Zusammensetzung der Trenngele war folgendermaßen: 15 % Acrylamid (Bio-Rad), 0.026 % Diallyltartardiamid (DATD, Bio-Rad) pro Prozent Acrylamid, 0.15 % SDS, 375 mM Tris-HCl pH 8.5, 0.14 mM Ammoniumperoxodisulphat (AMPER, Bio-Rad) und 0.035 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Bio-Rad). AMPER und TEMED dienten dabei als Radikalstarter für die Polymerisation. 2-4 h nach Polymerisation wurde das Sammelgel (3.1 % Acrylamid, 0.08 % Diallyltartardiamid, 0.1 % SDS, 125 mM Tris-HCl pH 7.0, 3 mM AMPER und 0.05 % TEMED) über das Trenngel gegossen und mit einem Teflonkamm versehen. Die Anoden- und Kathodenkammer wurde mit identischer Pufferlösung gefüllt: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0.1 % SDS, pH 8.5.

Es wurden jeweils 20 µl Probe in Lysispuffer (3 % Saccharose, 2 % SDS, 5 % β-Mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl pH 7.0, Bromphenolblau; 5 min. bei 100°C erhitzt) pro Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur über Nacht mit konstanter Stromstärke von 6mA für Gele der Größe 20x15cm durchgeführt. Anschließend wurden die Gele auf Nitrocellulose (NC) transferriert.

Für den Proteintransfer befand sich das Gel mit der anliegenden Nitrocellulose zwischen Whatman 3MM Filterpapier, leitfähigem, 1 cm dicken Schaumstoff und zwei Kohleplatten, die über Platinelektroden den Strom leiteten. Filterpapier, Schaumstoff und Nitrocellulose wurden gut mit Blot-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 20 % Methanol, pH 8.5) getränkt. Der Transfer fand bei 2 mA/cm² für 2 h statt. Freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose wurden für 1 h bei 37°C mit Cohen-Puffer (1 mg/ml Ficoll 400, 1 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 16 mg/ml Rinderserumalbumin, 0.1 % NP 40, 0.05 % Bacto-Gelatine in Natriumboratpuffer pH 8.2); (Cohen G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L. and Eisenberg, R.J.: Localisation and synthesis of an antigenic determinant of Herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibodies. J. Virol. 49 (1984) 4183-4187) abgesättigt. Der Blot wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit den Patientenseren (Verdünnung 1:100 in 154 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl pH 7.5) unter Schütteln inkubiert.

Nach der Seruminkubation wurde der Blot unter mit TTBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.01 % Tween 20) viermal für je 15 min gewaschen. Anschließend wurde der Blot mit Peroxidasegekoppeltem anti-human-Immunglobulin (DAKO, Hamburg, Verdünnung 1:1000 in 154 mM NaCl und 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TTBS wurde der Blot mit 0.5 mg/ml Diaminobenzidin und 0.01 % Wasserstoffperoxid in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 gefärbt. Die Färbung wurde anschließend mit 1N Schwefelsäure gestoppt, der Blot mit Wasser säurefrei gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet.

Eine Auswahl der Reaktionsmuster verschiedener Seren mit den Western Blot Streifen ist in den Abbildungen 1, 2a und b gezeigt.

Als immundominant erwiesen sich dabei folgende Proteine : p17 (17kDa), pC (22kDa) p41 (41kDa) und p100 (100kDa mit Größenvariation in verschiedenen B.burgdorferi-Isolaten). Bis auf p41 sind die biologischen Funktionen dieser Antigene unbekannt; p41 stellt das Flagellin Protein dar (Barbour, A.G.S., Hayes, S.F., Heiland, R.A., Schrumpf, M.E. and Tessier, S.L.: A Borrelia genus-specific monoclonal antibody binds to a flagellar epitope. Infect. Immun. 52 (1986) 549-554.).

Auf Grund dieser Analysen, die mit einer größeren Anzahl von Patientenseren aus den verschiedenen Krankheitsstadien durchgeführt wurde, ergaben sich Anhaltspunkte, daß mit einem einzigen Antigen nicht immer alle mit B. burgdorferi Infizierten erfaßt werden. Es zeigte sich, daß vor allem bei Seren mit IgM-Antikörpern (frische Infektion) neben dem Flagellin (p41) noch ein Protein (pC) im 22 kD Bereich besonders häufig erkannt wird. Das gleichzeitige Auftreten beider Antikörper war jedoch nicht zwingend. Es konnten sowohl Seren, die nur Antikörper gegen p41 oder nur Antikörper gegen das pC-Protein besaßen, gefunden werden (Abb. 1 und 2a, Western Blots). Bei der Neuroborreliose ist der Nachweis der intrathekal gebildeten Antikörper im Liquor von großer Bedeutung. IgG-Western Blots bei 12 Liquor-/Serum Paaren von Patienten mit einer lymphozytären Meningoradikulitis Bannwarth zeigten in allen Fällen eine lokale intrathekale Immunantwort gegen p41. Im Spätstadium wurden neben IgG-Antikörpern gegen das Flagellin vor allem Antikörper gegen Proteine im 100 kD Bereich (p100) und im 17 kD Bereich (p17) gefunden, die in den Frühstadien nicht oder nur selten nachweisbar waren. Somit sind Antikörperreaktivitäten gegen die p17- und p100-Proteine gute Marker für das Erreichen des Stadiums III (Abb. 2b, Western Blot).

Mit Hilfe dieser vier Antigene kann eine bessere Standardisierung der Teste erreicht werden.

Die Proteine p41, pC und p17 zeigen zudem nur eine geringe Kreuzreaktivität zu anderen Bakterienstämmen, das Protein p100 erwies sich als Genus-spezifisches Protein mit *B. burgdorferi* spezifischen Epitopen. Zusammenfassend sind in Tab. 2 (Reaktivität von Immunseren gegen verschiedene bakterielle Erreger mit Proteinen von *B. burgdorferi*) die Kreuzreaktivität von Seren gegen verschiedene verwandte Erreger mit *B. burgdorferi*-Antigenen nach Western Blot Analyse aufgeführt. Bei Versuchen, die vier Proteine (p41, pC, p17, p100) aus *B. burgdorferi* Extrakten zu reinigen, zeigte sich, daß große Mengen an Ausgangsmaterial benötigt werden. Besondere Schwierigkeit bereitete die Reinigung von p100, das im Gesamtextrakt unterrepräsentiert ist. Da die Kultivierung aufwendig und teuer ist, mußte nach gentechnologischen Möglichkeiten zur Herstellung dieser Antigene gesucht werden. Die Analyse von Patientenseren mittels Western Blot hat gezeigt, daß mit einer Kombination von gentechnologisch produzierten p41, pC, p17 sowie p100 als Antigen eine nahezu vollständige Erfassung aller positiven Seren erfolgen kann, und weiterhin eine Korrelation zum Krankheitsstadium gegeben ist.

Beispiel 2:

Gentechnologische Produktion von p41 (Flagellin) aus *B. burgdorferi* in *Escherichia coli*

Der kodierende Bereich von p41 wurde mittels DNA-Amplifizierung durch eine "polymerase chain reaction" (PCR) aus einer *B. burgdorferi* (DSM-Nr. 5662 P/Ko2/85) Gesamt-DNA Präparation gewonnen. Die so erhaltene Sequenz wurde anschließend unter die Kontrolle von induzierbaren Promotoren gestellt und nach Transfektion in *E. coli* zur Expression gebracht (Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor).

Hierfür wurden die *B. burgdorferi* Zellen 2 Wochen bei 37°C in 2 l modifiziertem Barbour-Stoenner-Kelly-(BSK) Medium (Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Schierz, G. (1986): European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks - culture

conditions and antibiotic susceptibility. Zbl. Bakt. Hyg. A 163, 112-118) kultiviert, bei 6000 rpm pelletiert, in TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl) gewaschen und in 20 ml Lysozym Puffer (20 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM EDTA, 5 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach Inkubation für 30 Min. bei 37°C wurden die durch die Einwirkung des Lysozyms auf die Zellwand entstehenden Protoplasten durch Zugabe von 1 ml 25 % SDS (Natriumdodecylsulfat) lysiert. Nach weiteren 10 min. wurden 4 ml einer 5 M NaCl Lösung hinzugegeben. Protein wurde durch Zugabe von einem gleichen Volumen TE-gesättigten (TE: 10 mM Tris/HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA) Phenol denaturiert. Durch Zentrifugation bei 4°C und 6500 rpm für 5 min. erfolgte die Separation der Phasen. Die obere DNA-haltige, wässrige Phase wurde mit einer Pipette mit weiter Öffnung (zur Vermeidung von Scherkräften) vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt und anschließend nochmals mit demselben Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:1:0,04) extrahiert. Nach der Separation wurde wiederum die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt und die DNA mit dem zweifachen Volumen Ethanol präzipitiert. Nach ca. 5 min. wird die als lange, fädige Gebilde ausgefallene DNA durch Aufwickeln an einem Glasstab entfernt und in eine 70 %ige Ethanolllösung zum Waschen überführt. Die an dem Glasstab durch Adhäsion gebundene DNA wurde anschließend 2 h bei Raumtemperatur gelagert, um ein Abdampfen des Ethanols zu bewirken, und dann in 4 ml TEN-Puffer überführt.

Je 1 µl der so erhaltenen B. burgdorferi Gesamt-DNA wurde in fünf 100µl PCR Ansätzen amplifiziert.

Als spezifische Primer für die Polymerase katalysierte Amplifikation wurden Sequenzen gewählt, die die Information für den translationalen Start sowie das 3'-Ende von p41 (Flagellin) enthielten. Es wurden hierfür die in Abb. 3 gezeigten DNA-Sequenzen verwendet. Die beiden Oligodesoxynukleotide wurden auf einem Milligen/Biossearch DNA-Synthesizer 8700 in 1 µmol Säulen synthetisiert, nach der Abspaltung mit Ammoniak durch Ethanol-Fällung grob gereinigt

und in je 400 μ l H_2O aufgenommen. Je 1 μ l dieser Oligodesoxynukleotid-Lösung wurden pro PCR-Ansatz eingesetzt; die Puffer, Nukleotide und die Taq-Polymerase stammten aus einem kommerziell erhältlichen Testkit (Cetus/Perkin-Elmer, Überlingen) und wurden auch nach den Testbeschreibungen verwendet. Die Temperaturbedingungen für die einzelnen Zyklen waren:

2 min. Denaturierung bei 94°C

2 min. Annealing bei 45°C

4 min. DNA-Synthese bei 73°C

50 Zyklen wurden durchgeführt.

Die Ansätze aus den PCRs wurden anschließend vereinigt, und die DNA nach Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 0,2 M mit dem 2,5 fachen an Ethanol bei -20°C für 5 h gefällt. Nach der Pelletierung und Waschen in 70 % Ethanol wurde die DNA in 200 μ l H_2O gelöst und nach Zugabe entsprechender Puffer mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Pst I (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers gespalten.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in einem 1,5 % Agarosegel wurde das amplifizierte DNA Fragment (ca. 1000 bp) isoliert und in einen mit BamHI und PstI geschnittenen pUC8 Vektor (Pharmacia) (Vieira, J.; Messing, J. (1982): The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259-268) inseriert, wobei 0,25 μ g des Vektors, 0,5 μ g des p41 Fragments und 2U T4-DNA-Ligase mit Puffer nach Angabe des Herstellers (Boehringer Mannheim) eingesetzt wurden.

Nach Transformation der ligierten DNA Fragmente in den E. coli Stamm JM 109 (Pharmacia) (Yanisch-Perron, C.; Vieira, J.; Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119) und Ausplattieren auf Agar-Platten mit Ampicillin (50 μ g/ml) und X-Gal (30 μ g/ml) wurden weiße Kolonien in 5 ml L-Broth Medium hochgezogen, und die isolierten Plasmide mittels Restriktionsenzym-Spaltung auf deren Inserts untersucht.

Das *B. burgdorferi* Flagellin-kodierende DNA-Fragment sitzt damit hinter dem induzierbaren lacUV5 Promoter des Vektors im selben Leserahmen wie das von diesem Promoter gestartete lacZ α -kodierende Transkript. Dadurch entsteht ein Flagellin, welches an seinem N-Terminus einige pUC8-kodierte Aminosäuren enthält. Dieser Bereich ist nachfolgend aufgeführt:

ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC ATC ATG ATT	
MET THR MET ILE THR ASN SER ARG GLY SER ILE MET ILE	
pUC8	p41

Von positiven *E. coli* Klonen (z. B. pUC8 ly13), die Vektor mit DNA Insert in der erwarteten Länge (1000 bp) enthielten, wurden wiederum Flüssigkulturen angelegt, und die Transkription von dem lac-Promotor des Plasmids durch 3-stündige Induktion mit 1 mM IPTG bei 37°C und Schütteln induziert. 1,5 ml dieser Kulturen wurden dann kurz pelletiert, die Bakterien mit "boiling mix" (3 % Saccharose, 2 % SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 2 % Bromphenolblau) bei 100°C für 10 min. lysiert, und die Proteine mittels 17,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Anfärben der Proteine durch Coomassie brilliant Blau zeigte sich bei den Zellen mit Plasmid-Insert eine neue, zusätzliche Bande bei ca. 41 kD, die der erwarteten Größe des Flagellins entspricht. Eine spezifische Reaktion dieses rekombinanten Antigens mit einem Serum eines Lyme Borreliose Patienten sowie mit einem monoklonalen Antikörper gegen *B. burgdorferi* p41 Flagellin ist in dem in Abb.4 gezeigten Immunoblot nachgewiesen.

Ebenso wie pUC8 ist auch jedes andere induzierbare Plasmid, das ein Transkript in demselben Leserahmen startet, für die Produktion von p41 geeignet. Durch Spaltung des p41-kodierenden Bereichs am Translationsstart mit BspHI (TC ATG A) und PstI (am 3'-Ende) und Einsetzen des Fragments in die NcoI-Stelle (CC ATG G) und PstI-Stelle eines sogenannten ATG-Vektors ist auch die Expression eines authentischen p41 möglich, welches keinerlei Fremdaminosäuren anfusioniert hat.

Für die nachfolgend aufgezeigten Verfahren wurde der Klon pUC8ly17 verwendet.

Beispiel 3:

Produktion von pC, OspA und p100 in E. coli aus
B. burgdorferi Genbanken

Zur Bereitstellung B. burgdorferi spezifischer DNA-Sequenzen wurde in E. coli eine chromosomale Gen-Bank angelegt. Mit Hilfe geeigneter Methoden wie Immunoscreening oder Hybridisierung mit ausgewählten Oligonukleotiden konnten in dieser Gen-Bank E. coli Klone identifiziert werden, welche entsprechende B. burgdorferi spezifische DNA-Sequenzen enthielten. Nach Restriktions-Enzym-Analyse wurde eine Restriktions-Enzym Karte erstellt. Diese konnte verwendet werden, um die gesuchten DNA-Sequenzen gezielt in Expressions-Vektoren zu überführen bzw deren Sequenzierung durchzuführen.

Dabei wurde im Einzelnen wie folgt vorgegangen: Zur Isolierung von B. burgdorferi (DSM-Nr. 5662) DNA (chromosomale DNA wie Plasmid DNA) wurden die Zellen wie unter Beispiel 2 beschrieben kultiviert. Nach Zentrifugation bei 12000 Upm für 20 Minuten wurden die Zellen gewaschen und in SET Puffer (20 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 50 mM EDTA) resuspendiert. Durch Zugabe von 15 mg/5 ml Lysozym für 20 Minuten wurde die Zellwand partiell gespalten. Anschließend wurden die protoplastierten Zellen durch Zugabe von SDS (n-Dodecylsulfat Natriumsalz) Endkonzentration 1 % lysiert. Nach 20 Minuten bei 37°C wurde Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) für zweimal 1 Stunde zugesetzt und die DNA enthaltende Lösung auf 100 mM NaCl mit TEN-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl) eingestellt. Es erfolgten eine Phenol-Extraktion und zwei weitere Phenol/Chloroform/iso-Amylalkohol-Extraktionen (Phenol:Chloroform im Verhältnis 1:1; Chloroform:iso-Amylalkohol im Verhältnis 24:1). Der so extrahierte Überstand wurde mit 2,5 vol. 95 % Ethanol versetzt und bei -20°C die DNA präzipitiert. Durch Aufwickeln auf einen Glasstab konnte die fädig ausgefallene DNA gewonnen und in 70 % Ethanol gewaschen

ERSATZBLATT

werden. Nach kurzer Trocknung im Exsiccator wurde die DNA in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA) der RNase (20 µg/ml) enthielt aufgenommen. Die so präparierte DNA wurde für die weiteren Schritte verwendet.

B. burgdorferi DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Sau 3A* (Boehringer Mannheim) nach den Angaben des Herstellers inkubiert. Durch die Wahl geeigneter Enzym-Verdünnungen bzw. Einwirkzeit des Enzyms auf DNA wurde eine partielle Spaltung derselben erreicht. So erhaltene partiell gespaltene DNA wurde mit, *BamH I*-restringierter und durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase dephosphorylierter Vektor DNA (*pUC18* oder andere geeignete Vektor DNA) ligiert. Dazu wurde *T4* DNA-Ligase (Boehringer Mannheim) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Pro Transformations-Ansatz wurden 0,2 - 0,5 µg/µl Gesamt DNA eingesetzt. *E. coli* JM 109 (oder andere geeignete *E. coli* Stämme) wurden nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan, D. (1985): *Techniques of Transformation of Escherichia coli*, S. 109-135. In: D.M. Glover (Hrsg.) *DNA cloning*, Vol.1. A practical approach. IRL Press, Oxford) bzw. nach Maniatis et.al. (Maniatis, T. (1982): *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) mit der ligierten DNA transformiert. Rekombinante *E.coli* Klone wurden auf LB-Medium (10 g Trypton, Difco, 5 g Hefeextrakt, Difco, 5 g NaCl, Merck), welches 100 µg/ml Ampicillin (oder ein anderes geeignetes Antibiotikum) enthielt, selektioniert und kultiviert. Das Koloniemuster wurde identisch auf LB-Platten übertragen und Kolonieabdrücke auf Nitrocellulose erstellt. Die Zellen dieser Kolonieabdrücke wurden je nach angewandtem Screening Verfahren auf dem Filter unterschiedlich lysiert. Bei Verwendung von mono- bzw. polyklonalen Seren (Immunoscreening) zur Detektion *B. burgdorferi* spezifischer Genprodukte, die durch die einrekombinierte DNA, induziert werden, wurden die Zellen 15 min über gesättigtem Chloroform-Dampf lysiert. Nach Absättigung des so behandelten Filters mit einer Magermilch-Lösung für 2 Stunden wurden die Filter über Nacht mit den verschiedenen Seren inkubiert, mehrmals mit TTBS-Puffer

gewaschen (s.o.) und für 2 Stunden mit dem zweiten Peroxidase konjugierten Antikörper (Dako, Hamburg) inkubiert. Erneutes Waschen mit TTBS-Puffer diente zur Reduzierung unspezifisch gebundener Peroxidase konjugierter Antikörper. Durch enzymatische Umsetzung der Substrate Diaminobenzidin (Sigma-Chemie, München) und H_2O_2 in ein unlösliches braunes Pigment konnten positive, d.h. B. burgdorferi Antigen produzierende E. coli Klone erkannt werden. Die so erkannten positiven E.coli Klone wurden von der Ausgangs-Platte angeimpft und analysiert. Bei Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden zur Hybridisierung und damit zur Detektion spezifischer B. burgdorferi Antigen Sequenzen (Screening durch Hybridisierung) wurden die Zellen auf dem Nitrocellulose Filter (Schleicher & Schuell) alkalisch lysiert (durch Benetzen der Filter für 5 Minuten mit 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). Nach Neutralisierung (durch Benetzen der Filter für 5 Minuten in 1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl pH 8,0) wurden die Filter mit der denaturierten DNA mit 2x SSPE (20x SSPE: 3,6 M NaCl, 200 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4, 20 mM EDTA, pH 7,4) benetzt und getrocknet. Durch Backen der Filter für 2 Stunden bei 80°C wurde die DNA fixiert. Die so behandelten Filter wurden dann für die Hybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte unter Verwendung radioaktiver (^{32}P) bzw. nicht radioaktiver (z.B. Digoxigenin, Boehringer Mannheim) Nachweismethoden. Hierbei wurde nach bekannten (Maniatis, T. (1982): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor) bzw. vom Hersteller (Boehringer Mannheim) empfohlenen Markierungsmethoden (^{32}P -Markierung mit ^{32}P -gamma-ATP und Kinasereaktion bzw Digoxigenin-Markierung mit Dig-11-UTP und terminaler Transferase-Reaktion) verfahren. Von positiven E. coli Klonen wurde eine Restriktions-Enzym-Analyse erstellt und mit dieser Information eine Expression der Antigen kodierenden DNA-Sequenzen in geeigneten Vektoren bzw. deren Sequenzierung durchgeführt.

Als Hybridisierungsproben wurden zu Beginn synthetische Oligodesoxynukleotide eingesetzt, deren Sequenz anhand

von p100 und pC Aminosäuren-Sequenzen ausgewählt wurden. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Aus Lysaten von *B. burgdorferi* wurden die beiden Proteine durch Extraktion mit n-Octyl β -D-Thioglucopyranosid partiell aufgereinigt und weiter durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die Antigene durch Western Blotting auf eine Glasfibernmatrix übertragen und die entsprechenden Stücke mit den *B. burgdorferi*-Proteinen ausgeschnitten. p100 wurde dann N-terminal ansequenziert und die ersten 22 Aminosäuren des Aminoterminus bestimmt (Diese Methode des "micro-sequencing" ist beschrieben in: Eckerskorn, C., Mewes, W., Goretzki, H. and Lottspeich, F.: A new siliconized fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins. Eur. J. Biochem. 176 (1988) 509-519). Bei pC war eine direkte Ansequenzierung nicht möglich, da der N-Terminus einer Sequenzierung nicht direkt zugänglich ist, d.h. daß hier eventuell eine Myristilierung oder ähnliche Modifikationen vorliegen. Deshalb wurde dieses Protein tryptisch gespalten, die Fragmente mittels HPLC aufgetrennt und zwei davon dann ansequenziert. Aus den so gewonnenen Aminosäure-Abfolgen wurden dann die nachfolgend aufgeführten Oligodesoxynukleotid-Sequenzen abgeleitet. Da meist mehrere Codon-Möglichkeiten für eine Aminosäure bestehen, mußten an den entsprechenden Stellen des Oligonukleotids auch die Basenvariationen berücksichtigt werden und während der Synthese in äquimolaren Verhältnissen eingebaut werden.

p100-p1 - p100 - Aminosäuren-Sequenz:

Glu Leu Asp Lys Glu Lys Leu Lys Asp Phe Val Asn Leu Asp Leu
Glu Phe Val Asn Thr

p100 - Oligodesoxynukleotid-Sequenz, die in Klammern angegebenen und durch ";" getrennten Basen wurden während der Synthese (auf Milligen/Biosearch 8700 DNA Synthesizer) in äquimolaren Verhältnissen eingebaut:

GA(G;A) (C;T)T(G;T;A) GA(C;T) AA(G;A) GA(G;A) AA(G;A)
 (C;T)T(G;T;A) AA(G;A) GA(C;T) TT(C;T) GT(T;A) AA(C;T)
 (C;T)T(G;T;A) GA(C;T) (C;T)A(G;T;A) GA(G;A) TT(C;T) GT(T;A)
 AA(C;T) TA(C;T) A

Die Oligodesoxynukleotid-Sequenz wurde als Sonde verwendet und mit den die B. burgdorferi DNA enthaltenden Klonen hybridisiert. Nach Subklonierung wurde ein Klon erhalten, der das Gen für p100 enthält. Es wurde folgende kodierende DNA-Sequenz von p100 (5'-Ende) des Stammes PKo bei einer Länge von 346 Basenpaaren ermittelt:

5' ATG AAA AAA ATG TTA CTA ATC TTT AGT TTT TTT CTT GTT
 TTT TTA AAT GGA TTT CCT CTT AAT GCA AGG GAA GTT GAT AAG GAA
 AAA TTA AAG GAC TTT GTT AAT ATG GAT CTT GAA TTT GTT AAT TAC
 AAG GGT CCT TAT GAT TCT ACA AAT ACA TAT GAA CAA ATA GTA GGT
 ATT GGG GAG TTT TTA GCA AGG CCG TTG ATC AAT TCC AAT AGT AAG
 TCA AGT TAT TAT GGT AAA TAT TTT GTT AAT AGA TTT ATT GAC GAT
 CAA GAT AAA AAA GCA AGT GTT GAT ATT TTT TCT ATT GGT AGT AAG
 TCA GAG CTT GAT AGT ATA TTA AAT CTA AGA AGA ATT C... 3'

Nach vollständiger Klonierung wurde die folgende Aminosäuresequenz ermittelt:

RECEIVED

AUG 23 2000

TECH. CENTER
AUG 23 2000

Met	Lys	Lys	Met	Leu	Leu	Ile	Phe	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Phe	Leu
Asn	Gly	Phe	Pro	Leu	Asn	Ala	Arg	Glu	Val	Asp	Lys	Glu	Lys	Leu
Lys	Asp	Phe	Val	Asn	Met	Asp	Leu	Glu	Phe	Val	Asn	Tyr	Lys	Gly
Pro	Tyr	Asp	Ser	Thr	Asn	Thr	Tyr	Glu	Gln	Ile	Val	Gly	Ile	Gly
Glu	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Ser	Asn	Ser	Ser
Tyr	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Asn	Arg	Phe	Ile	Asp	Asp	Gln	Asp
Lys	Lys	Ala	Ser	Val	Asp	Ile	Phe	Ser	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Glu
Leu	Asp	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu
Ile	Lys	Ser	Phe	Asp	Tyr	Glu	Arg	Ser	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Ala
Lys	Ala	Ile	Thr	Ile	Tyr	Asn	Ala	Val	Tyr	Arg	Gly	Asp	Leu	Asp
Tyr	Tyr	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ile	Glu	Ala	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr
Lys	Glu	Asn	Ala	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Tyr	Ser	Gln	Trp	Ala	Gly
Lys	Thr	Gln	Ile	Phe	Ile	Pro	Leu	Lys	Lys	Asn	Ile	Leu	Ser	Gly
Asn	Val	Glu	Ser	Asp	Ile	Asp	Ile	Asp	Ser	Leu	Val	Thr	Asp	Lys
Val	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Asn	Glu	Ser	Gly	Val	Asn	Phe
Ala	Arg	Asp	Ile	Thr	Asp	Ile	Gln	Gly	Glu	Thr	His	Lys	Ala	Asp
Gln	Asp	Lys	Ile	Asp	Ile	Glu	Leu	Asp	Asn	Phe	His	Glu	Ser	Asp
Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Leu	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu
Lys	Ala	Thr	Asp	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Glu	Ile	Glu	Ser	Gln	Val
Asp	Ala	Lys	Lys	Lys	Gln	Lys	Glu	Glu	Leu	Asp	Lys	Lys	Ala	Ile
Asp	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Gln	Lys	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Asp	Asn
Leu	Asp	Ile	Gln	Arg	Asp	Thr	Val	Arg	Glu	Lys	Leu	Gln	Glu	Asn
Ile	Asn	Glu	Thr	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Pro	Gly	Asp
Val	Ser	Ser	Pro	Lys	Val	Asp	Lys	Gln	Leu	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser
Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu	Ala	Ser	Asp	Glu	Asn
Gln	Lys	Arg	Glu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ile	Glu	Ile	Lys	Lys	Asn	Asp
Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Asp	His	Lys	Ala	Leu	Asp	Leu	Lys
Gln	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Ala	Ser	Ser	Lys	Glu	Lys	Ile	Glu	Gly
Glu	Glu	Glu	Asp	Lys	Glu	Leu	Asp	Ser	Lys	Lys	Asn	Leu	Glu	Pro
Val	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Val	Asp	Lys	Ile	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn
Asn	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Asp	Glu	Pro	Ser	Tyr	Ser
Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Glu	Gly	Val	Asp	Asn	Lys	Asp	Val	Asp	Leu
Gln	Lys	Thr	Lys	Pro	Gln	Val	Glu	Ser	Gln	Pro	Thr	Ser	Leu	Asn
Glu	Asp	Leu	Ile	Asp	Val	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser	Asn	Pro	Val	Phe
Leu	Glu	Val	Ile	Asp	Pro	Ile	Thr	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu	Gln	Leu
Ile	Asp	Leu	Asn	Thr	Gly	Val	Arg	Leu	Lys	Glu	Ser	Ala	Gln	Gln
Gly	Ile	Gln	Arg	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Glu	Arg	Glu	Lys	Asp	Leu	Val
Val	Ile	Lys	Ile	Asp	Ser	Gly	Lys	Ala	Lys	Leu	Gln	Ile	Leu	Asp
Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Val	Ile	Ser	Glu	Ser	Asn	Phe	Glu	Ile
Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser	Arg	Met	Ile	Leu	Val
Val	Val	Lys	Asp	Asp	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Leu	Ala	Lys	Phe	Ser
Pro	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	Phe	Ile	Leu	Ser	Glu	Asn	Lys	Ile	Leu
Pro	Phe	Thr	Ser	Phe	Ala	Val	Arg	Lys	Asn	Phe	Ile	Tyr	Leu	Gln
Asp	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Leu	Lys
Lys	Val	Lys												

Aminosäuresequenz des p100 Proteins

In analoger Weise wurden über die pC-Aminosäuresequenzen:
 p1: Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Thr Val Leu Ala Val Lys
 p2: Asp Leu Phe Glu Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys

die entsprechenden Oligodesoxynukleotid-Sequenzen synthetisiert:

pC-p1-Oligodesoxynukleotid-Sequenz:

AA(G;A) AT(T;A) AC(A;T) GA(T;C) (A;T)C(A;T) AA(T;C) GC(A;T)
 AC(A;T) GT(A;T) (T;C)T(G;A;T) GC(A;T) GT(A;T) AA(A;G) A

pC-p2-Oligodesoxynukleotid-Sequenz:

GA(T;C) (C;T)T(G;A;T) TT(T;C) GA(G;A) (T;A)C(A;T) GT(A;T)
 GA(G;A) GG(A;T;C) (T;C)T(G;A;T) (T;C)T(G;A;T) AA(A;G) A

Nach dem Auffinden von geeigneten Klonen durch Hybridisierung und Subklonierung des gewünschten Gens konnte folgende kodierende DNA-Sequenz von pC des Stammes PKo bei einer Länge von 639 Basenpaaren ermittelt werden:

```

5' ATG AAA AAG AAT ACA TTA AGT GCG ATA TTA ATG ACT TTA
TTT TTA TTT ATA TCT TGT AAT AAT TCA GGG AAG GTG GGG ATT CTG
CAT CTA CTA ATC CTG CTG ACG AGT CTT GCG AAA GGG CCT AAT CTT
ACA GAA ATA AGC AAA AAA ATT ACA GAT TCT AAT GCA TTT GTA CTT
GCT GTT AAA GAA GTT GAG ACT TTG GTT TTA TCT ATA GAT GAA CTT
GCT AAG AAA GCT ATT GGT CAA AAA ATA GAC AAT AAT AAT GGT TTA
GCT GCT TTA AAT AAT CAG AAT GGA TCG TTG TTA GCA GGA GCC TAT
GCA ATA TCA ACC CTA ATA ACA GAA AAA TTG AGT AAA TTG AAA AAT
TTA GAA GAA TTA AAG ACA GAA ATT GCA AAG GCT AAG AAA TGT TCC
GAA GAA TTT ACT AAT AAA CTA AAA AGT GGT CAT GCA GAT CTT GGC
AAA CAG GAT GCT ACC GAT GAT CAT GCA AAA GCA GCT ATT TTA AAA
ACA CAT GCA ACT ACC GAT AAA GGT GCT AAA GAA TTT AAA GAT TTA
TTT GAA TCA GTA GAA GGT TTG TTA AAA GCA GCT CAA GTA GCA CTA
ACT AAT TCA GTT AAA GAA CTT ACA AGT CCT GTT GTA GCA GAA AGT
CCA AAA AAA CCT TAA 3'

```

Das Protein pC weist bei einer Länge von 212 Aminosäuren folgende Sequenzen auf:

```

Met Lys Lys Asn Thr Leu Thr Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu
Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Val Gly Ile Leu Thr Ser
Thr Asn Pro Ala Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu
Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val Leu Ala Val
Lys Glu Val Glu Thr Leu Val Leu Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys
Lys Ala Ile Gly Gln Lys Ile Asp Asn Asn Asn Gly Leu Ala Ala
Leu Asn Asn Gln Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile
Ser Thr Leu Ile Thr Glu Lys Leu Ser Lys Leu Lys Asn Leu Glu
Glu Leu Lys Thr Glu Ile Ala Lys Ala Lys Lys Cys Ser Glu Glu
Phe Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His Ala Asp Leu Gly Lys Gln
Asp Ala Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr His
Ala Thr Thr Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys Asp Leu Phe Glu
Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala Leu Thr Asn
Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys
Lys Pro

```

Aminosäuresequenz des PC Proteins - 22kD -

In entsprechender Weise wurde auch ein Teil der kodierenden DNA-Sequenz von OspA (5'-Ende) des Stammes PKo bei einer Länge von 680 Basenpaare ermittelt:

```

5' ATG AAA AAA TAT TTA TTG GGA ATA GGT CTA ATA TTA GCC
TTA ATA GCA TGC AAG CAA AAT GTT AGC AGC CTT GAT GAA AAA AAC
AGC GCT TCA GTA GAT TTG CCT GGT GAG ATG AAA GTT CTT GTA AGT
AAA GAA AAA GAC AAA GAC GGT AAG TAC AGT CTA AAG GCA ACA GTA
GAC AAG ATT GAG CTA AAA GGA ACT TCT GAT AAA GAC AAT GGT TCT
GGG GTG CTT GAA GGT ACA AAA GAT GAC AAA AGT AAA GCA AAA TTA
ACA ATT GCT GAC GAT CTA AGT AAA ACC ACA TTC GAA CTT TTC AAA
GAA GAT GGC AAA ACA TTA GTG TCA AGA AAA GTA AGT TCT AAA GAC
AAA ACA TCA ACA GAT GAA ATG TTC AAT GAA AAA GGT GAA TTG TCT
GCA AAA ACC ATG ACA AGA GAA AAT GGA ACC AAA CTT GAA TAT ACA
GAA ATG AAA AGC GAT GGA ACC GGA AAA GCT AAA GAA GTT TTA AAA
AAC TTT ACT CTT GAA GGA AAA GTA GCT AAT GAT AAA GTA ACA TTG
GAA GTA AAA GAA GGA ACC GTT ACT TTA AGT AAG GAA ATT GCA AAA
TCT GGA GAA GTA ACA GTT GCT CTT AAT GAC ACT AAC ACT ACT CAG
GCT ACT AAA AAA ACT GGC GCA TGG GAT TCA AAA ACT TCT ACT TTA
ACA ATT AGT GT...3'

```

ERSATZBLATT

Nach vollständiger Sequenzierung konnte die folgende Aminosäuresequenz für das 31 kD Protein ermittelt werden:

Met	Lys	Lys	Tyr	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Ile
Ala	Cys	Lys	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Leu	Asp	Glu	Lys	Asn	Ser	Ala
Ser	Val	Asp	Leu	Pro	Gly	Glu	Met	Lys	Val	Leu	Val	Ser	Lys	Glu
Lys	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ala	Thr	Val	Asp	Lys
Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Asp	Lys	Asp	Asn	Gly	Ser	Gly	Val
Leu	Glu	Gly	Thr	Lys	Asp	Asp	Lys	Ser	Lys	Ala	Lys	Leu	Thr	Ile
Ala	Asp	Asp	Leu	Ser	Lys	Thr	Thr	Phe	Glu	Leu	Phe	Lys	Glu	Asp
Gly	Lys	Thr	Leu	Val	Ser	Arg	Lys	Val	Ser	Ser	Lys	Asp	Lys	Thr
Ser	Thr	Asp	Glu	Met	Phe	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Leu	Ser	Ala	Lys
Thr	Met	Thr	Arg	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Tyr	Thr	Glu	Met
Lys	Ser	Asp	Gly	Thr	Gly	Lys	Ala	Lys	Glu	Val	Leu	Lys	Asn	Phe
Thr	Leu	Glu	Gly	Lys	Val	Ala	Asn	Asp	Lys	Val	Thr	Leu	Glu	Val
Lys	Glu	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Lys	Glu	Ile	Ala	Lys	Ser	Gly
Glu	Val	Thr	Val	Ala	Leu	Asn	Asp	Thr	Asn	Thr	Thr	Gln	Ala	Thr
Lys	Lys	Thr	Gly	Ala	Trp	Asp	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile
Ser	Val	Asn	Ser	Lys	Lys	Thr	Thr	Gln	Leu	Val	Phe	Thr	Lys	Gln
Asp	Thr	Ile	Thr	Val	Gln	Lys	Tyr	Asp	Ser	Ala	Gly	Thr	Asn	Leu
Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Glu	Ile	Lys	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Lys	Asn
Ala	Leu	Lys												

Aminosäuresequenz von OspA (Stamm Pko)

Beispiel 4:

Reinigung der rekombinant produzierten B. burgdorferi Antigene

a) am Beispiel des p41 (Flagellin)

Eine 50 ml Übernachtskultur des in Beispiel 2 beschriebenen Klons pUC8ly2 wurde in 1,5 ml frisches L-Broth Medium gegeben und bei 37°C und intensiven Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 wurde die Kultur mit IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und für weitere 3 h inkubiert. Die Bakterien wurden pelletiert (6000 rpm, 10 min.), in 300 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,5 mg/ml Lysozym resuspendiert und für 45 min. in ein 37°C Wasserbad gegeben. Nach der Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 150 mM und Triton-X-100 in einer Endkonzentration von 1 % wurde weiter für 45 min. bei 37°C inkubiert, und die Suspension anschließend dreimal für je 5 min. mit Ultraschall behandelt. Unlösliche Bestandteile wurden bei 9000 rpm in 30 min. pelletiert, in 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM Dithiothreitol und 1 % Octyl-glucopyranosid (Sigma-Chemie, München) resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach der anschließenden Pelletierung unlöslicher Bestandteile bei 17000 rpm in 30 min. wurde der Überstand vorsichtig dekantiert.

Anschließend wurde das Pellet in 150 ml 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Harnstoff, 1 % β -Mercaptoethanol durch Rühren für 2 h resuspendiert. Auch hier unlösliche Bestandteile wurden erneut durch Zentrifugation bei 17000 rpm in 30 min. abgetrennt, und der Überstand auf eine DEAE-Sephacel-Säule (Pharmacia, Freiburg) mit einem Gelvolumen von 550 ml (3 cm Durchmesser, 80 cm Höhe) gepumpt. Die Elution des p41 Antigens erfolgte in einem NaCl-Gradienten von 0-800 mM in einem Gesamtvolumen von 600 ml. Das rekombinante p41 wird bei einer NaCl-Konzentration von etwa 0,25 M eluiert. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und weiter durch eine HPLC mit einer Mono Q Säule (Anionenaustauscher) aufgereinigt (Abb.4). Ein Elutionsprofil mit dem gereinigten p41 in einem NaCl-Gradienten von 0-800 mM ist in Abb.5 gezeigt. Die hier p41-positiven Fraktionen (nach Western Blot Analyse) wurden gegen 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM $MgCl_2$ und 0,1 % β -Mercaptoethanol dialysiert und anschließend für die in Beispiel 5 gezeigten Tests verwendet. Aus einer Reinigung von p41 ausgehend von 1 l Bakterienkultur kann typischerweise eine Ausbeute von 5 bis 10 mg erwartet werden.

ERSATZBLATT

Nach Sequenzierung konnte die folgende Aminosäuresequenz ermittelt werden:

Met	Arg	Gly	Ser	Ile	Met	Ile	Ile	Asn	His	Asn	Thr	Ser	Ala	Ile
Asn	Ala	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ile	Asn	Ala	Ala	Asn	Leu	Ser	Lys
Thr	Gln	Glu	Lys	Leu	Ser	Ser	Asn	Tyr	Arg	Ile	Asn	Arg	Ala	Ser
Asp	Asp	Ala	Ala	Gly	Met	Gly	Val	Ser	Gly	Lys	Ile	Asn	Ala	Gln
Ile	Arg	Gly	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser	Arg	Asn	Thr	Ser	Lys	Ala	Ile
Asn	Phe	Ile	Gln	Thr	Thr	Glu	Gly	Asn	Leu	Asn	Glu	Val	Glu	Lys
Val	Leu	Val	Arg	Met	Lys	Glu	Leu	Ala	Val	Gln	Ser	Gly	Asn	Gly
Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Asp	Arg	Gly	Ser	Ile	Gln	Ile	Glu	Ile	Glu
Gln	Leu	Thr	Asp	Glu	Ile	Asn	Arg	Ile	Ala	Asp	Gln	Ala	Gln	Tyr
Asn	Gln	Met	His	Met	Leu	Ser	Asn	Lys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asn	Val
Lys	Thr	Ala	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Gln	Pro	Ala	Lys	Ile	Asn	Thr
Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Gln	Ala	Ser	Trp	Thr	Leu	Arg	Val
His	Val	Gly	Ala	Asn	Gln	Asp	Glu	Ala	Ile	Ala	Val	Asn	Ile	Tyr
Ser	Ala	Asn	Val	Ala	Asn	Leu	Phe	Ala	Gly	Glu	Gly	Ala	Gln	Ala
Ala	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Gly	Ala	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala
Gln	Gln	Pro	Thr	Pro	Ala	Thr	Ala	Pro	Thr	Gln	Gly	Gly	Val	Asn
Ser	Pro	Val	Asn	Val	Thr	Thr	Thr	Val	Asp	Ala	Asn	Thr	Ser	Leu
Ala	Lys	Ile	Glu	Asn	Ala	Ile	Arg	Met	Ile	Ser	Asp	Gln	Arg	Ala
Asn	Leu	Gly	Ala	Phe	Gln	Asn	Arg	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Asn	Ser
Thr	Glu	Tyr	Ala	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys	Ala	Ser	Tyr	Ala	Gln	Ile
Lys	Asp	Ala	Thr	Met	Thr	Asp	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Thr	Asn
Ser	Ile	Leu	Thr	Gln	Ser	Ala	Met	Ala	Met	Ile	Ala	Gln	Ala	Asn
Gln	Val	Pro	Gln	Tyr	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg				

Aminosäuresequenz des p41 Proteins

b) Reinigung von rekombinantem *Borrelia burgdorferi* Antigen
pC aus *E.coli*

Ein Klon, der das Gen für das Antigen pC enthält, (pDS1PC5) wird in 100ml L-Broth (mit 50 µg Ampicillin/ml) angeimpft, über Nacht wachsen gelassen und dann in 900ml L-Broth/Ampicillin - doppelt konzentrierter Hefeextrakt/2ml Glycerin - überführt, nach ca. 1h mit 2mM IPTG induziert und 2 - 3h weiter geschüttelt.

Nach Abzentrifugieren bei 8000 Upm für 10 min. wird das Pellet in 20ml Lyse-Puffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 2mM EDTA, 0.1mM DTE, 0.1mM PMSF; 0.4 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach 30 min. Rühren bei Raumtemperatur erfolgt Zugabe von Triton-X 100 (Endkonzentration 0.1 - 0.2 %). Zusätzlich werden 10 µl Benzonase (Merck) zugegeben. Es wird weitere 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Die jetzt klare Suspension wird mit festem NaCl auf 1M NaCl eingestellt und weitere 30 min. - 60 min. gerührt (bei 4°C).

Nach Zentrifugation bei 4°C, 30 min., 15.000 Upm befindet sich das pC-Protein quantitativ im Überstand. Das Pellet wird verworfen. Der Überstand wird gegen 10mM Tris-HCl, pH 8.0 bei mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert. Nach Zentrifugation und/oder Filtration wird auf DEAE-Sepharose (Pharmacia) aufgetragen, wobei die Säule mit 10mM Tris-HCl, pH 8.0 equilibriert wird. Bei Elution mit 0 M NaCl befindet sich das pC-Protein im 2. Peak des Durchlaufs. Die ersten Fraktionen können verworfen werden, der Rest wird gesammelt und rechromatographiert. Die Trennsäule wird mit 1 M NaCl regeneriert und in 10mM Tris-HCl pH 8.0 equilibriert. Das so erhaltene Antigen kann nun in einem geeigneten Testkit bspw. einem ELISA verwendet werden.

c) Reinigung von rekombinantem *Borrelia burgdorferi* Antigen
OspA aus *E.coli*

Ein Klon, der das Gen für das Antigen OspA enthält (pDS1OspA) wird in 100ml L-Broth (mit 50 µg Ampicillin/ml) angeimpft und über Nacht angezogen. Die Kulturbrühe wird in 900ml L-Broth/Ampicillin - doppelt konzentrierter Hefeextrakt/2ml Glycerin - überführt, nach ca. 1h mit 2mM IPTG induziert und 2 - 3h weiter geschüttelt.

Die Zellen werden bei 6000Upm, 5min. abzentrifugiert und das Pellet in 20ml Lyse-Puffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 2mM EDTA, 0,1mM DTE, 0,1mM PMSF; 0,4mg/ml Lysozym) resuspendiert. Nach 30min. Rühren bei Raumtemperatur erfolgt Zugabe von Triton-X 100 (Endkonzentration 0,5 - 1 %). Zusätzlich werden 10 µl Benzonase (MERCK) zugegeben. Darauf wird weitere 30min. bei Raumtemperatur gerührt.

Die jetzt klare Suspension wird mit festem NaCl auf 1M NaCl eingestellt und weiter gerührt (bei 4°C). Nach Zentrifugation bei 4°C für 30min. und 15.000Upm befindet sich OspA beinahe quantitativ im Pellet. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2M Harnstoff (mit 50mM Tris-HCl, pH 7,5, 2mM EDTA, 0,1mM DTE) resuspendiert. OspA ist nun im Überstand.

Der Überstand wird im Dialyse-Schlauch gegen 5mM MES (2-[N-Morpholino]ethan-sulfonsäure) Puffer, pH 6.0 dialysiert, wobei ein mehrmaliger Pufferwechsel unbedingt erforderlich ist. Nach Zentrifugation und Filtration wird das Protein auf S-Sepharose fast flow (Pharmacia) Säule aufgetragen. Zuerst wird mit 0 M NaCl gewaschen, dann mit einem Gradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert. Das OspA-Antigen eluiert als scharfer Peak bei etwa 0,4 M NaCl. Nach Dialyse gegen 10 mM-Tris-HCl pH 7,5 kann das OspA Antigen in einem geeigneten Testkit, bspw. einem ELISA verwendet werden.

Beispiel 5:

**Einsatz rekombinant produzierter B. burgdorferi Antigene
(Beispiel p41) im ELISA**

Bedingt durch die hohe Reinheit der produzierten rekombinanten Antigene sind B. burgdorferi spezifische Tests möglich, die maschinenlesbar und ohne großen technischen und personellen Aufwand durchführbar sind.

Mikrotiterplatten wurden mit je 50 µl des gereinigten p41 (Konzentration 0,5 - 5 µg/ml) pro Napf beschichtet. Die Platten wurden nach Standardmethoden bei 4°C über Nacht

inkubiert, gewaschen und die noch freien Bindungsstellen 2 %iger Rinderserum-Albumin-Lösung abgesättigt. Anschließend wurden jeweils 50 µl Serum (Verdünnung 1:200) dazupipettiert, für 2 h bei 37°C inkubiert, ungebundene Teile abgewaschen und die gebundenen Immunkomplexe mit je 50 µl Peroxidase-markiertem anti-human IgG (Verdünnung 1:1000) detektiert. Nach abermaligen Waschen wurden die Näpfe mit je 100 µl ortho-Phenylendiamin (Konzentration 0,1 % in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 mit 0,03 % H₂O₂) als Färbereagens beschickt und die im Dunkeln durchgeführte Färbung nach 10 min. mit 100 µl 1 N Schwefelsäure gestoppt. Die Mikrotiterplatte wurde in einem Photometer bei 486 nm ausgewertet (Abb. 6).

In dem hier gezeigten Beispiel wurden 7 positive und 8 negative anti-B. burgdorferi Seren ausgetestet. Von den klinisch gesicherten Lyme-positiven Seren waren drei, die auf Western Blot Streifen mit B. burgdorferi als Antigen keine Reaktion mit p41 zeigten, d.h. Seren aus dem Frühstadium der Infektion darstellten. Diese reagierten im ELISA mit dem rekombinanten Antigen ebenfalls nur grenzwertig. Normal p41-positive Seren dagegen reagierten sehr gut, während Lyme-negative Seren im Bereich von unter einer OD = 0,3 blieben.

Beispiel 6:

Herstellung B. burgdorferi spezifischer monoklonaler Antikörper

Weibliche Balb/c Mäuse wurden mit B. burgdorferi (DSM-Nr. 5662) intraperitoneal immunisiert. Die 1. Immunisierung erfolgte mit kompletten Freund'schen Adjuvans, 2-5 weitere Immunisierungen mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans folgten im Abstand von 2 Wochen. 2 Wochen später wurde das Antigen ohne Adjuvans appliziert und 3 Tage später die Mäuse getötet und die Milz entfernt.

Die Milz-Lymphozyten wurden mit Maus-Myelom-Zellen (Ag8-653) im Verhältnis 1:1 gemischt, sedimentiert und mit Fusionslösung (2,5 g Polyethylenglykol (PEG), 2,5 ml RPMI-Medium, 250 µl DMSO) versetzt: 1 min. Zugabe der Fusionslösung, 90 sek.

Inkubation bei 37°C. Die Zellen wurden erneut sedimentiert, das PEG entfernt und Kulturmedium (HAT-Medium) hinzugegeben. Schließlich wurde die Zellsuspension in Mikrotiterplatten, die Makrophagen als Feederzellen enthielten, ausgesät und bebrütet. Hybridoma-Überstände wurden unverdünnt im indirekten Immunfluoreszenz (IFT) getestet (Wilske, B.; Schierz, G.; Preac-Mursic, V.; Weber, K.; Pfister, H.-W.; Einhäupl, K. (1984): Serological diagnosis of Erythema migrans disease and related disorders. Infection, 12, 331-337).

IFT-positive Zellüberstände wurden mittels Western Blot analysiert. Im Western Blot reaktive Hybridomas wurden 4 mal mittels "limiting dilution" subkloniert und bezüglich ihrer Immunglobulin-Klasse und IgG-Subklasse identifiziert.

Auf diese Weise wurden folgende monoklonale Antikörper (MAB) erhalten:

1. MAB gegen p41:

(a) L41 1C11

Dieser Antikörper war mit allen 30 getesteten B. burgdorferi Stämmen und mit Rückfallfieber Borrelien (außer B. hermsii), nicht jedoch mit Treponemen reaktiv.

(b) L41 1D3

Dieser Antikörper war mit der Mehrzahl (21 von 24) der B. burgdorferi Stämme, nicht jedoch mit Rückfallfieber Borrelien und Treponemen reaktiv.

2. MAB gegen p100 (L100 1D4):

Dieser Antikörper war mit allen 30 getesteten B. burgdorferi Stämmen, nicht jedoch mit Rückfallfieber Borrelien oder Treponemen reaktiv.

3. MAB gegen pC (L22 1F8):

Dieser MAB war mit pC-Proteinen von Haut- und Liquorstämmen reaktiv, dagegen waren die pC-Proteine einiger, aber nicht aller Zeckenstämme negativ.

4. MAB gegen OspA:

OspA ist ein Hauptprotein (30 kD-Bereich) der äußeren Membran der meisten B. burgdorferi Stämme. OspA Proteine

europäischer *B. burgdorferi* Stämme sind antigenetisch heterogen und unterscheiden sich antigenetisch von den amerikanischen Stämmen. Die wenigen OspA-negativen Stämme haben pC-Proteine.

(a) L 32 2E7

Insgesamt waren 29 von 32 Stämmen reaktiv. Die negativen Stämme wiesen kein OspA-Protein auf. Die 3 negativen Stämme waren mit dem pC-spezifischen MAB L22 1F8 reaktiv.

(b) L32 1G3:

Dieser MAB war nur bei 3 von 25 getesteten Stämmen reaktiv.

Die Kombination von MAB L32 2E7 und MAB L22 1F8 sowie die Reaktion mit MAB L100 1D4 erlaubt die Identifizierung von *B. burgdorferi* Borrelien und Treponemen. Eine sichere Identifizierung und Differenzierung von *B. burgdorferi* war mit bisher verfügbaren monoklonalen Antikörpern nicht möglich.

Beispiel 7:

Ermittlung der Aminosäuresequenz eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 22kD aus einem anderen Stamm

Gemäß dem in den vorstehenden Beispielen beschriebenen Methoden wurde die Aminosäuresequenz eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 22 kD ermittelt. Dieses Protein wurde aus einem anderen Borrelien-Stamm kloniert und anschließend sequenziert. Dieser Stamm wurde bei der ATCC unter der Nummer 35210 hinterlegt und ist allgemein zugänglich. Dabei wurde folgende Aminosäuresequenz ermittelt:

Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu
 Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ser Ala
 Asn Ser Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile
 Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys
 Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Ile Ala Ala Lys
 Ala Ile Gly Lys Lys Ile His Gln Asn Asn Gly Leu Asp Thr Glu
 Asn Asn His Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile Ser
 Thr Leu Ile Lys Gln Lys Leu Asp Gly Leu Lys Asn Glu Gly Leu
 Lys Glu Lys Ile Asp Ala Ala Lys Lys Cys Ser Glu Thr Phe Thr
 Asn Lys Leu Lys Glu Lys His Thr Asp Leu Gly Lys Glu Gly Val
 Thr Asp Ala Asp Ala Lys Glu Ala Ile Leu Lys Thr Asn Gly Thr
 Lys Thr Lys Gly Ala Glu Glu Leu Gly Lys Leu Phe Glu Ser Val
 Glu Val Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu Ala Asn Ser Val
 Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys Lys Pro

Aminosäuresequenz von PC Protein

Beispiel 8:

Vergleich von Testkits mit erfindungsgemäßen Proteinen gegenüber solchen, bei denen ein Ultrasonikat verwendet wurde

Es wurden 74 Seren von Patienten mit Erythema migrans auf IgM- und IgG-Antikörper getestet. Zusätzlich wurde eine negative Kontrollgruppe von 100 Blutspendern überprüft. Bei den Tests wurden gemäß an sich bekannten ELISA-Testdurchführungsmethoden einmal Ultrasonikatpräparationen von *Borrelia burgdorferi* eingesetzt. Andererseits wurden erfindungsgemäß hergestellte rekombinante Proteine getrennt und gemeinsam eingesetzt. Die nachfolgenden Tabellen zeigen eindeutig, daß durch das erfindungsgemäße Verfahren eine beträchtlich höhere Sensitivität erreicht werden kann im Vergleich zu dem Einsatz von Ultrasonikat.

NACHWEIS von IgM-Antikörpern

ELISA/Antigen	Erythema migrans (n=74)
Ultrasonikat	20 27.0%
p41 (recomb.)	22 29.7%
OspA (rekomb.)	7 9.4%
pC (rekomb.)	26 35.1%
p41 und/oder pC	34 45.9%
p41 und/oder pC und/oder OspA	34 45.9%

NACHWEIS von IgG-Antikörpern

ELISA/Antigen	Erythema migrans (n=74)
Ultrasonikat	17 22.9%
p41 (recomb.)	23 31.1%
OspA (rekomb.)	6 8.1%
pC (rekomb.)	27 36.5%
p41 und/oder pC	34 45.9%
p41 und/oder pC und/oder OspA	35 47.3%

**NACHWEIS von IgG-und/oder
IgM-Antikörpern****ELISA/Antigen****Erythema migrans
(n = 74)**

Ultrasonikat	30 40%
p41 (recomb.)	39 53%
OspA (rekomb.)	11 15%
pC (rekomb.)	41 55%
p41 und/oder pC	53 72%
p41 und/oder pC und/oder OspA	53 72%

ERSATZBLATT

Beschreibung der Tabellen

Tab. 1:

Reaktivität von Lyme Borreliose-Seren aus verschiedenen Krankheitsstadien mit B.burgdorferi-Antigenen (p17, pC, p41, p100) im Western Blot mit B.burgdorferi-Lysat als Antigen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die immundominanten Proteine in verschiedenen Stadien der Lymeborreliose.

1.1 Seren von gesunden Personen und in höherem Maße von Syphilispatienten wiesen Antikörper gegen p60 ("common antigen") auf. Seltener wurden Antikörper gegen p41 festgestellt.

1.2. Als immundominante Proteine erwiesen sich bei Frühmanifestationen (EM und LMR) das Flagella-Protein p41 und das pC-Protein. pC ist das immundominante Protein für die frühe Immunantwort. Insbesondere IgM-Antikörper gegen pC können früher auftreten als IgM-Antikörper gegen p41 (s. auch Abb. 2a)

1.3. Seren von Patienten mit Spätmanifestationen (ACA und Arthritis) reagierten in allen Fällen (n=22) mit p41 oder p100 und in 21 Fällen mit p100 oder p17. p17 war in 17, p100 in 19 und p41 in 20 Fällen reaktiv.

1.4. Die intrathekale IgG-Immunantwort war in allen 12 untersuchten Fällen gegen p41 gerichtet. Antikörper gegen p41 waren in 3 Fällen im Serum nicht nachweisbar.

Tab. 2

Reaktivität von Immunsereen (gegen verschiedene bakterielle Erreger) mit Proteinen von B.burgdorferi (Western Blot).

Western Blot-Streifen mit elektrophoretisch aufgetrenntem B.burgdorferi-Lysat wurden wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt und mit Seren gegen verschiedene mehr oder weniger verwandte und deshalb kreuzreagierende Erreger inkubiert. Die

Seren stammten von Kaninchen, die mit den jeweiligen Erregern immunisiert worden waren. Die geringste Kreuzreaktivität besitzt p100; nur eines (anti-B. hermsii) der getesteten 15 Erreger-spezifischen Seren reagiert mit diesem Protein. p41 und pC reagieren mit jeweils drei der Seren und scheinen deshalb auch noch geeignet für eine diagnostische Anwendung. Deutlich ist das Vorhandensein von immun-konservierten Antigenen zu erkennen; so reagieren zum Beispiel 14 bzw. 12 der getesteten Seren mit Proteinen der Größe 40 bzw. 60 kD (p40; p60). Diese "common antigens" sind deshalb ungeeignet für den diagnostischen Einsatz.

Tab. 1: Immundominante Proteine für die humorale Immunantwort bei Lyme Borreliose

1.1. Reaktivität von humanen Kontrollseren (IgG Western Blot)

	pC	p41	p60	Anzahl
Gesunde	-	2	3	17
Syphilis	-	1	5	9

1.2. Immunantwort gegen pC und p41 bei Erythema migrans (EM) und Lymphozytärer Meningoradikulitis (LMR) (Western Blot)

Diagnose	reaktive Proteine		Ig Klasse	Anzahl
	p41	pC		
EM	11	13	IgM	15 ¹⁾
LMR	13	10	IgM	20 ¹⁾
	14	3	IgG	15 ²⁾

1) Die Seren waren im IgM-IPT-ABS Test positiv.

2) Die Seren waren im IgG-IPT-ABS Test positiv.

1.3. Immunantwort gegen p100, p41 und p17 (IgG Western Blot)

Diagnose	p100	p41	p17	p100 od. p41	p100 od. p17	Anzahl
ACA	8	8	9	10	10	10
Arthritis	11	12	8	12	11	12

1.4. Intrathekale Immunantwort bei Lymphozytärer Meningoradikulitis (IgG Western Blot)

	lokale intrathekale Immunantwort	Reaktivität im Serum	Anzahl
p41	12	9	12
andere Proteine	7	12	12

ib. 2: Reaktivität von Immunsereen (gegen verschiedene bakterielle Erreger) mit Proteinen von B. burgdorferi (Western Blot)

Protein	p100	p75 p70 p60	p41 p40	OspB p33 OspA p30	p23 pC p21
B. hermsii	+	+	+	+	+
T. phagedenis	+	+	+	+	+
T. pallidum	+	+	+	+	+
L. grippotyphosa	+	+	+	+	+
C. jejuni	+	+	+	+	+
E. coli	+	+	+	+	+
S. typhimurium	+	+	+	+	+
Sh. flexneri	+	+	+	+	+
Y. enterocolitica O3	+	+	+	+	+
Y. enterocolitica O9	+	+	+	+	+
P. aeruginosa	+	+	+	+	+
H. influenzae	+	+	+	+	+
N. meningitidis	+	+	+	+	+
L. monocytogenes O1	+	+	+	+	+
L. micdadei	+	+	+	+	+
Σ	1	12	12	14	3

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 a und b:

Reaktivität von B.burgdorferi-infizierten Patienten mit Lysaten von 5 verschiedenen B. burgdorferi Stämmen im Western Blot.

Getestet wurden Seren der Stadien II und III (Neuroborreliose, Stadium II (IgM und IgG); Acrodermatitis (IgG) und Arthritis (IgG), Stadium III). Die frühe Immunantwort ist unabhängig vom Teststamm gegen ein enges Spektrum von Borrelienproteinen gerichtet (pC und p41). Die späte Immunantwort ist gegen ein breites Panel von Borrelienproteinen gerichtet. Immundominante Proteine sind (unabhängig vom Teststamm) p100 (mit variablen Molekulargewicht) und p41.

Abb. 2

2a) Verlaufskontrolle (IgM-Westernblot) bei Erythema migrans

Das pC-Protein kann das immundominante Protein der frühen Immunantwort sein. Antikörper gegen p41 können später auftreten und nur schwach ausgeprägt sein. Bei längerer Krankheitsdauer können auch IgM-Antikörper gegen p17 auftreten.

2b) IgG-Western Blot bei Spätmanifestationen

IgG-Antikörper erkennen ein breites Spektrum von Borrelienproteinen. Bei Verwendung des Stammes PKo erweisen sich als immundominante Proteine p17 und p100. p17 wird vom Stamm PKo stark ausgeprägt (im Gegensatz zu anderen Stämmen; siehe Abb.1). Das Flagellin p41 wurde in 2 dieser Beispiele (Serum 1 und 2) nicht erkannt.

Abb. 3

Schema der DNA-Amplifizierung der p41-kodierenden Region.

A; Ausschnitt der B.burgdorferi-DNA mit der p41-kodierenden Region (schwarzer Balken).

B; Vergrößerung des 5' bzw 3' Endes des p41-Gens mit des jeweiligen DNA-Sequenzen. Angegeben ist zusätzlich der Translationsstart (ATG) sowie das Stop-Codon am 3'-Ende (TAA). Die für die PCR benutzten Primer-Sequenzen sind zusätzlich unter (Primer 1) bzw über (Primer 2) dem p41 kodierende DNA-Doppelstrang angegeben. Eine Anhybridisierung der Primer kann nur mit den jeweiligen 3'-Bereichen erfolgen. Die 5'-Enden enthalten nicht-hybridisierende Teile, die Schnittstellen für Restriktions-Enzyme darstellen: GGATCC - BamHI; TCATGA - BspHI, am 5'- Ende; GACGTC - PstI am 3'-Ende.

Abb. 4

Expression, Reaktivität und Reinigung von rekombinantem p41.

linker Teil: Coomassie-blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. Die einzelnen Spuren waren wie folgt beladen: 1, E.coli-Lysat, negative Kontrolle; 2, E.coli-Lysat mit pUC8ly17 nach IPTG-Induktion, das rekombinant produzierte p41 ist als zusätzliche Bande im Bereich von ca 45kDa zu erkennen; 3, Überstand des Lysats aus 2 nach Aufbrechen der Zellen wie in Beispiel 4 beschrieben; 4, Pellet-Fraktion der lysierten Zellen mit dem rekombinanten p41; 5, Octyl-gluco-pyranosid Überstand; 6, wie 5, jedoch Pellet-Fraktion; 7 - 10, Fraktionen nach Elution von p41 von einer MonoQ-Säule durch einen Salzgradienten; Spuren 9 und 10 enthalten rekombinantes p41, bedingt durch Degradationserscheinungen sowie unvollständige Translation treten neben dem vollständigen Produkt noch kleiner Fragmente auf, die sich jedoch auch in authentischen p41-Material aus B.burgdorferi finden lassen.

rechter Teil: Immun-gefärbter Western Blot eines SDS-Geles mit Proben des Coomassie-gefärbten Gels. Die Immunfärbung wurde mit einem in Beispiel 6 beschriebenen monoklonalen Antikörper durchgeführt. Bezeichnung der Spuren bzw der Proben wie Coomassie-gefärbtes Gel; Spur 0, Leerspür.

Abb. 5

HPLC-Elutionsprofil von p41 aus einer Ionenaustauscher-Säule mit einem Salzgradient.

Im Anschluß an die Anionenaustauscher-Reinigung (MonoQ von Pharmacia) von p41 wurde das Antigen gegen 4M Harnstoff ohne Salz zurückdialysiert und wiederum auf die MonoQ-Säule gegeben, um die Reinheit zu überprüfen. Das Elutionsprofil zeigt nur noch einen Proteinadsorptionsgipfel. Der kleinere Gipfel unmittelbar vor dem Hauptanteil entspricht dem in Abb. 4, Spur 8 sichtbaren p41-Fragment mit einer Größe von ca 30 kD (getestet durch Western Blot).

Abb. 6:

IgG-ELISA mit rekombinantem p41 als Antigen.

Das über Anionenaustauscher (MonoQ) gereinigte rekombinante Antigen (s. Abb. 5) wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Es wurden 7 Seren von Patienten mit einer klinisch definierten Lyme Borreliose und 8 Seren von Gesunden getestet. 4 Seren der Lyme Borreliose Patienten waren im Western Blot stark reaktiv mit dem rekombinanten p41 (= positiv), 3 Seren schwach reaktiv (= grenzwertig), die Seren der Gesunden reagierten nicht (= negativ). Der IgG-ELISA zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Y-Achse: Optische Dichte bei Wellenlänge 486 nm; grenzw. = grenzwertig

Abb. 7

Reaktivität von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene B.burgdorferi Antigene.

Sechs monoklonale Antikörper gegen B. burgdorferi wurden mit 30 verschiedenen B. burgdorferi-Stämmen, 4 Rückfallfieberborrelien-Stämmen und 2 verschiedenen Treponemen getestet. In der Abbildung sind drei verschiedene B. burgdorferi Isolate (1=B31, amerikan. Stamm; 2=PKo, deutscher Hautstamm; 3=PB1, deutscher Liquorstamm), eine Rückfallfieberborreliose (4=B. hermsii) und ein Treponemenstamm (5=T. phagedenis) exemplarisch dargestellt. Es wurden die

gemäß Beispiel 6 hergestellten monoklonalen Antikörper eingesetzt.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Immunologisch aktives Protein von *Borrelia burgdorferi*, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer von anderen aus *Borrelia burgdorferi* stammenden Proteinen freien Form vorliegt.
2. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es gentechnologisch hergestellt wurde.
3. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es unter Verwendung von aus *Borrelia burgdorferi* isolierter DNA herstellbar ist.
4. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es unter Verwendung von aus *Borrelia burgdorferi* (DSM-Nr. 5662) isolierter DNA herstellbar ist.
5. Immunologisch aktives Protein nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 41 kDa aufweist.
6. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

Met Arg Gly Ser Ile Met Ile Ile Asn His Asn Thr Ser Ala Ile
 Asn Ala Ser Arg Asn Asn Ala Ile Asn Ala Ala Asn Leu Ser Lys
 Thr Gln Glu Lys Leu Ser Ser Asn Tyr Arg Ile Asn Arg Ala Ser
 Asp Asp Ala Ala Gly Met Gly Val Ser Gly Lys Ile Asn Ala Gln
 Ile Arg Gly Leu Ser Gln Ala Ser Arg Asn Thr Ser Lys Ala Ile
 Asn Phe Ile Gln Thr Thr Glu Gly Asn Leu Asn Glu Val Glu Lys
 Val Leu Val Arg Met Lys Glu Leu Ala Val Gln Ser Gly Asn Gly
 Thr Tyr Ser Asp Ser Asp Arg Gly Ser Ile Gln Ile Glu Ile Glu
 Gln Leu Thr Asp Glu Ile Asn Arg Ile Ala Asp Gln Ala Gln Tyr
 Asn Gln Met His Met Leu Ser Asn Lys Ser Ala Ser Gln Asn Val
 Lys Thr Ala Glu Glu Leu Gly Met Gln Pro Ala Lys Ile Asn Thr
 Pro Ala Ser Leu Ser Gly Ser Gln Ala Ser Trp Thr Leu Arg Val
 His Val Gly Ala Asn Gln Asp Glu Ala Ile Ala Val Asn Ile Tyr
 Ser Ala Asn Val Ala Asn Leu Phe Ala Gly Glu Gly Ala Gln Ala
 Ala Gln Ala Ala Pro Val Gln Glu Gly Ala Gln Glu Glu Gly Ala
 Gln Gln Pro Thr Pro Ala Thr Ala Pro Thr Gln Gly Gly Val Asn
 Ser Pro Val Asn Val Thr Thr Thr Val Asp Ala Asn Thr Ser Leu
 Ala Lys Ile Glu Asn Ala Ile Arg Met Ile Ser Asp Gln Arg Ala
 Asn Leu Gly Ala Phe Gln Asn Arg Leu Glu Ser Ile Lys Asn Ser
 Thr Glu Tyr Ala Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ser Tyr Ala Gln Ile
 Lys Asp Ala Thr Met Thr Asp Glu Val Val Ala Ala Thr Thr Asn
 Ser Ile Leu Thr Gln Ser Ala Met Ala Met Ile Ala Gln Ala Asn
 Gln Val Pro Gln Tyr Val Leu Ser Leu Leu Arg

oder Teilsequenzen davon aufweist.

7. Immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 22 kDa aufweist.

8. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

Met Lys Lys Asn Thr Leu Thr Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu
 Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Val Gly Ile Leu Thr Ser
 Thr Asn Pro Ala Asp Glu Ser Ala Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu
 Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Phe Val Leu Ala Val
 Lys Glu Val Glu Thr Leu Val Leu Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys
 Lys Ala Ile Gly Gln Lys Ile Asp Asn Asn Asn Gly Leu Ala Ala
 Leu Asn Asn Gln Asn Gly Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Ala Ile
 Ser Thr Leu Ile Thr Glu Lys Leu Ser Lys Leu Lys Asn Leu Glu
 Glu Leu Lys Thr Glu Ile Ala Lys Ala Lys Lys Cys Ser Glu Glu
 Phe Thr Asn Lys Leu Lys Ser Gly His Ala Asp Leu Gly Lys Gln
 Asp Ala Thr Asp Asp His Ala Lys Ala Ala Ile Leu Lys Thr His
 Ala Thr Thr Asp Lys Gly Ala Lys Glu Phe Lys Asp Leu Phe Glu
 Ser Val Glu Gly Leu Leu Lys Ala Ala Gln Val Ala Leu Thr Asn
 Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Ala Glu Ser Pro Lys
 Lys Pro

oder eine Teilsequenz davon aufweist.

9. Immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 17 kDa aufweist.

10. Immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa aufweist.

11. Immunologisch aktives Protein nach Anspruch 1 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

Met	Lys	Lys	Met	Leu	Leu	Ile	Phe	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Phe	Leu
Asn	Gly	Phe	Pro	Leu	Asn	Ala	Arg	Glu	Val	Asp	Lys	Glu	Lys	Leu
Lys	Asp	Phe	Val	Asn	Met	Asp	Leu	Glu	Phe	Val	Asn	Tyr	Lys	Gly
Pro	Tyr	Asp	Ser	Thr	Asn	Thr	Tyr	Glu	Gln	Ile	Val	Gly	Ile	Gly
Glu	Phe	Leu	Ala	Arg	Pro	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Ser	Asn	Ser	Ser
Tyr	Tyr	Gly	Lys	Tyr	Phe	Val	Asn	Arg	Phe	Ile	Asp	Asp	Gln	Asp
Lys	Lys	Ala	Ser	Val	Asp	Ile	Phe	Ser	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Glu
Leu	Asp	Ser	Ile	Leu	Asn	Leu	Arg	Arg	Ile	Leu	Thr	Gly	Tyr	Leu
Ile	Lys	Ser	Phe	Asp	Tyr	Glu	Arg	Ser	Ser	Ala	Glu	Leu	Ile	Ala
Lys	Ala	Ile	Thr	Ile	Tyr	Asn	Ala	Val	Tyr	Arg	Gly	Asp	Leu	Asp
Tyr	Tyr	Lys	Glu	Phe	Tyr	Ile	Glu	Ala	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr
Lys	Glu	Asn	Ala	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Tyr	Ser	Gln	Trp	Ala	Gly
Lys	Thr	Gln	Ile	Phe	Ile	Pro	Leu	Lys	Lys	Asn	Ile	Leu	Ser	Gly
Asn	Val	Glu	Ser	Asp	Ile	Asp	Ile	Asp	Ser	Leu	Val	Thr	Asp	Lys
Val	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Glu	Asn	Glu	Ser	Gly	Val	Asn	Phe
Ala	Arg	Asp	Ile	Thr	Asp	Ile	Gln	Gly	Glu	Thr	His	Lys	Ala	Asp
Gln	Asp	Lys	Ile	Asp	Ile	Glu	Leu	Asp	Asn	Phe	His	Glu	Ser	Asp
Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Ile	Glu	Asn	Leu	Arg	Asp	Gln	Leu	Glu
Lys	Ala	Thr	Asp	Glu	Glu	His	Lys	Lys	Glu	Ile	Glu	Ser	Gln	Val
Asp	Ala	Lys	Lys	Lys	Gln	Lys	Glu	Glu	Leu	Asp	Lys	Lys	Ala	Ile
Asp	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Gln	Lys	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Asp	Asn
Leu	Asp	Ile	Gln	Arg	Asp	Thr	Val	Arg	Glu	Lys	Leu	Gln	Glu	Asn
Ile	Asn	Glu	Thr	Asn	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Pro	Gly	Asp
Val	Ser	Ser	Pro	Lys	Val	Asp	Lys	Gln	Leu	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser
Leu	Glu	Asp	Leu	Gln	Glu	Gln	Leu	Lys	Glu	Ala	Ser	Asp	Glu	Asn
Gln	Lys	Arg	Glu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ile	Glu	Ile	Lys	Lys	Asn	Asp
Glu	Glu	Leu	Phe	Lys	Asn	Lys	Asp	His	Lys	Ala	Leu	Asp	Leu	Lys
Gln	Glu	Leu	Asn	Ser	Lys	Ala	Ser	Ser	Lys	Glu	Lys	Ile	Glu	Gly
Glu	Glu	Glu	Asp	Lys	Glu	Leu	Asp	Ser	Lys	Lys	Asn	Leu	Glu	Pro
Val	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Val	Asp	Lys	Ile	Ser	Lys	Ser	Asn	Asn
Asn	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Asp	Glu	Pro	Ser	Tyr	Ser
Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Glu	Gly	Val	Asp	Asn	Lys	Asp	Val	Asp	Leu
Gln	Lys	Thr	Lys	Pro	Gln	Val	Glu	Ser	Gln	Pro	Thr	Ser	Leu	Asn
Glu	Asp	Leu	Ile	Asp	Val	Ser	Ile	Asp	Ser	Ser	Asn	Pro	Val	Phe
Leu	Glu	Val	Ile	Asp	Pro	Ile	Thr	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu	Gln	Leu
Ile	Asp	Leu	Asn	Thr	Gly	Val	Arg	Leu	Lys	Glu	Ser	Ala	Gln	Gln
Gly	Ile	Gln	Arg	Tyr	Gly	Ile	Tyr	Glu	Arg	Glu	Lys	Asp	Leu	Val
Val	Ile	Lys	Ile	Asp	Ser	Gly	Lys	Ala	Lys	Leu	Gln	Ile	Leu	Asp
Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Val	Ile	Ser	Glu	Ser	Asn	Phe	Glu	Ile
Asn	Lys	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser	Arg	Met	Ile	Leu	Val
Val	Val	Lys	Asp	Asp	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Leu	Ala	Lys	Phe	Ser
Pro	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	Phe	Ile	Leu	Ser	Glu	Asn	Lys	Ile	Leu
Pro	Phe	Thr	Ser	Phe	Ala	Val	Arg	Lys	Asn	Phe	Ile	Tyr	Leu	Gln
Asp	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asp	Val	Asn	Thr	Leu	Lys

Lys Val Lys oder eine Teilsequenz davon aufweist.

12. Immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Molekulargewicht von etwa 31 kDa aufweist.

13. Immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

```
Met Lys Lys Tyr Leu Leu Gly Ile Gly Leu Ile Leu Ala Leu Ile
Ala Cys Lys Gln Asn Val Ser Ser Leu Asp Glu Lys Asn Ser Ala
Ser Val Asp Leu Pro Gly Glu Met Lys Val Leu Val Ser Lys Glu
Lys Asp Lys Asp Gly Lys Tyr Ser Leu Lys Ala Thr Val Asp Lys
Ile Glu Leu Lys Gly Thr Ser Asp Lys Asp Asn Gly Ser Gly Val
Leu Glu Gly Thr Lys Asp Asp Lys Ser Lys Ala Lys Leu Thr Ile
Ala Asp Asp Leu Ser Lys Thr Thr Phe Glu Leu Phe Lys Glu Asp
Gly Lys Thr Leu Val Ser Arg Lys Val Ser Ser Lys Asp Lys Thr
Ser Thr Asp Glu Met Phe Asn Glu Lys Gly Glu Leu Ser Ala Lys
Thr Met Thr Arg Glu Asn Gly Thr Lys Leu Glu Tyr Thr Glu Met
Lys Ser Asp Gly Thr Gly Lys Ala Lys Glu Val Leu Lys Asn Phe
Thr Leu Glu Gly Lys Val Ala Asn Asp Lys Val Thr Leu Glu Val
Lys Glu Gly Thr Val Thr Leu Ser Lys Glu Ile Ala Lys Ser Gly
Glu Val Thr Val Ala Leu Asn Asp Thr Asn Thr Thr Gln Ala Thr
Lys Lys Thr Gly Ala Trp Asp Ser Lys Thr Ser Thr Leu Thr Ile
Ser Val Asn Ser Lys Lys Thr Thr Gln Leu Val Phe Thr Lys Gln
Asp Thr Ile Thr Val Gln Lys Tyr Asp Ser Ala Gly Thr Asn Leu
Glu Gly Thr Ala Val Glu Ile Lys Thr Leu Asp Glu Leu Lys Asn
Ala Leu Lys
```

oder eine Teilsequenz davon aufweist.

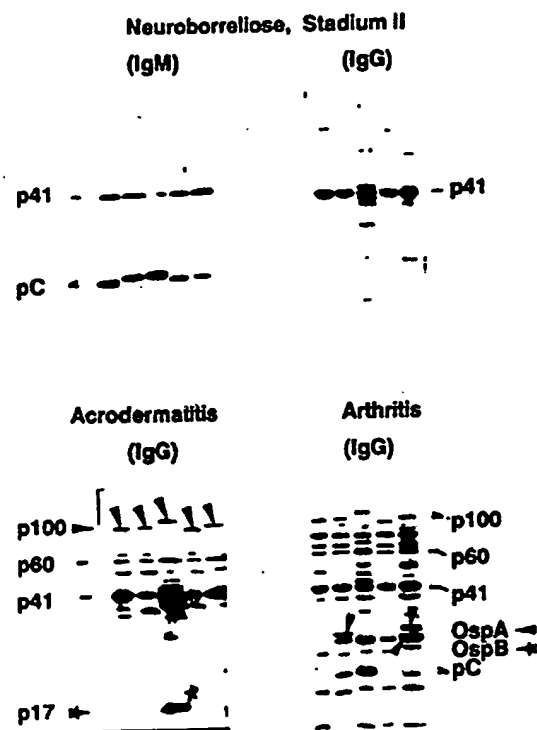
14. Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen Borrelia-Stämme, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens ein immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 enthält, das mit den in der Untersuchungsflüssigkeit vorhandenen Antikörpern reagieren kann und, daß es wenigstens eine Anzeigekomponente aufweist, die den Nachweis von Komplexen aus immunologisch aktivem Protein und Antikörper ermöglicht.

15. Testkit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß es 2 bis 4 immunologisch aktive Proteine nach den Ansprüchen 1 bis 13 enthält.

16. Testkit nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzeigeekomponente ein gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichteter Antikörper ist, der eine Markierung aufweist.
17. Testkit nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung in einem radioaktiven Isotop besteht.
18. Testkit nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung aus einem Enzym besteht, das eine Farbreaktion katalysieren kann.
19. Testkit nach den Ansprüchen 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das immunologisch aktive Protein oder ein dagegen gerichteter monoklonaler Antikörper biotinyliert ist und die Anzeigeekomponente Avidin oder Streptavidin mit daran kovalent gebundenem Enzym, insbesondere Peroxydase ist.
20. Testkit nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es ein ELISA-Testkit ist.
21. Testkit nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein immunologisch aktives Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 13 an Mikrotiterplatten gekoppelt ist und die Anzeigeekomponente aus Anti-human- Immunglobulin, insbesondere IgG- und/oder IgM-Antikörpern besteht, an die ein eine Farbreaktion katalysierendes Enzym gekoppelt ist.
22. Verwendung von immunologisch aktiven Proteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Herstellung von Impfstoffen zum Schutz gegen Infektionen von Borrelia-Bakterien, vorzugsweise Borrelia burgdorferi-Stämmen.

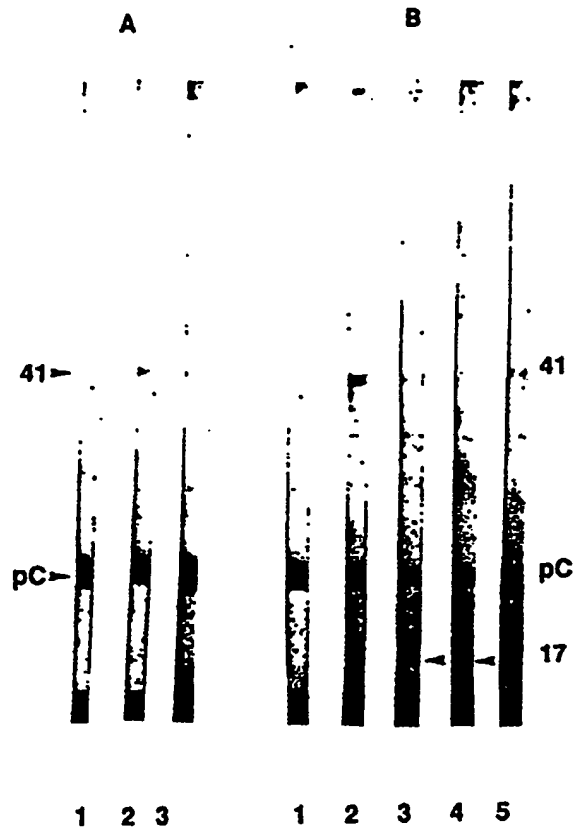
1/9

Abb. 1: IgG Western Blot mit 5 verschiedenen Stämmen als Antigen
IgG und IgM-Antwort im Stadium II
IgG-Antwort im Stadium III



2/9

Abb. 2a: IgM Western Blot bei Erythema migrans
Antigen: B. burgdorferi / Stamm PKo



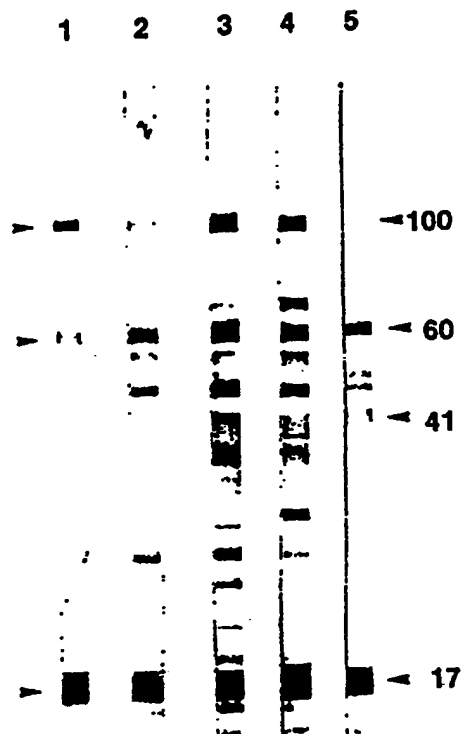
Patient A: 1 Erstuntersuchung
 2, 3 Verlaufskontrolle nach 1 und 3 Wochen

Patient B: 1 Erstuntersuchung
 2-5 Verlaufskontrollen nach 2, 9, 10 und 11 Wochen

ERSATZBLATT

3/9

Abb. 2b: IgG-Western Blot bei Spätmanifestationen
Antigen: B. burgdorferi / Stamm PKo

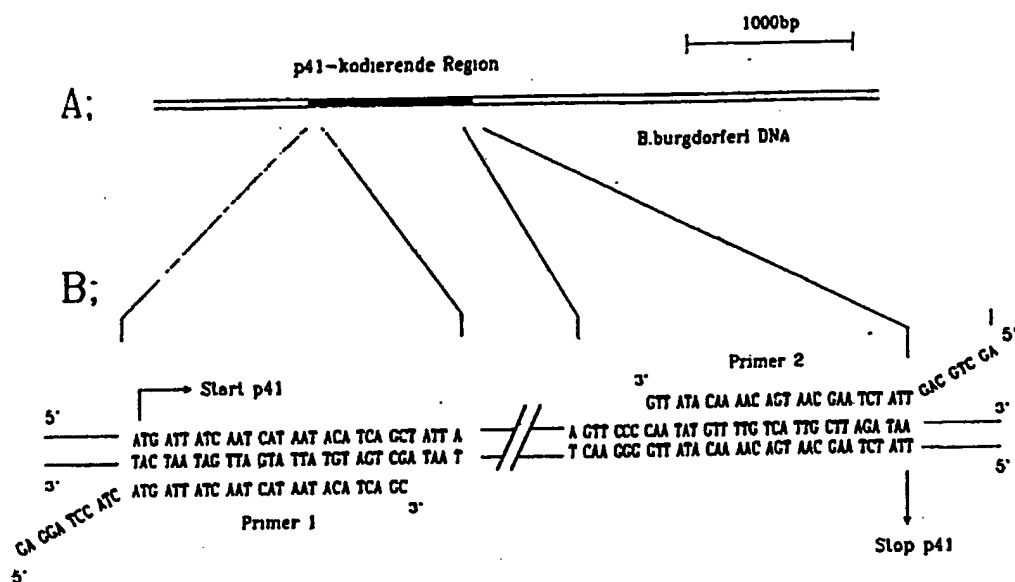


1, 2, 3 Acrodermatitis
4, 5 Arthritis

ERSATZBLATT

4/9

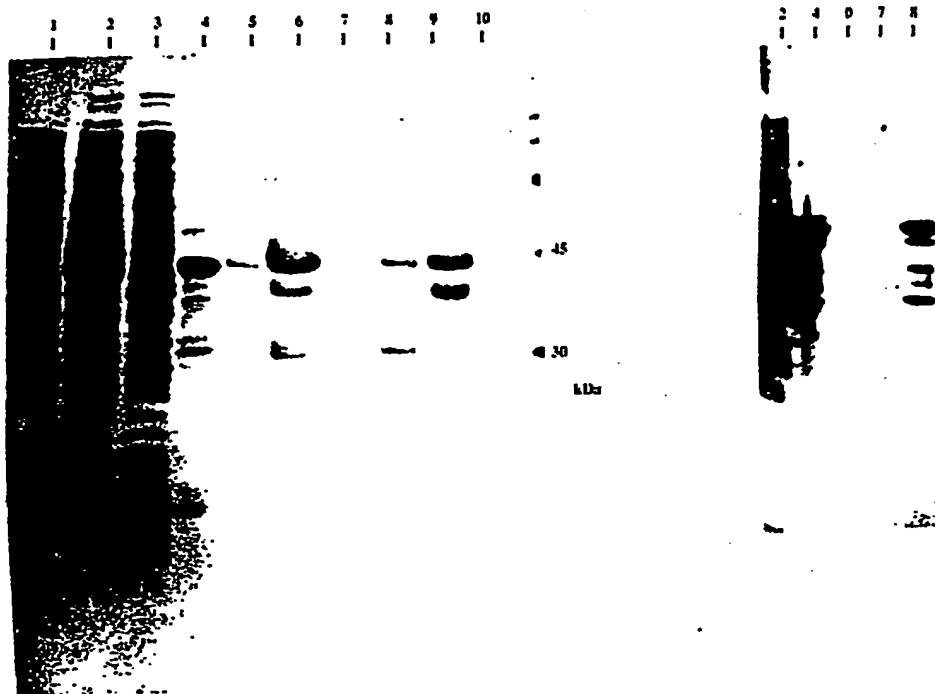
Abb. 3



ERSATZBLATT

5/9

Abb. 4

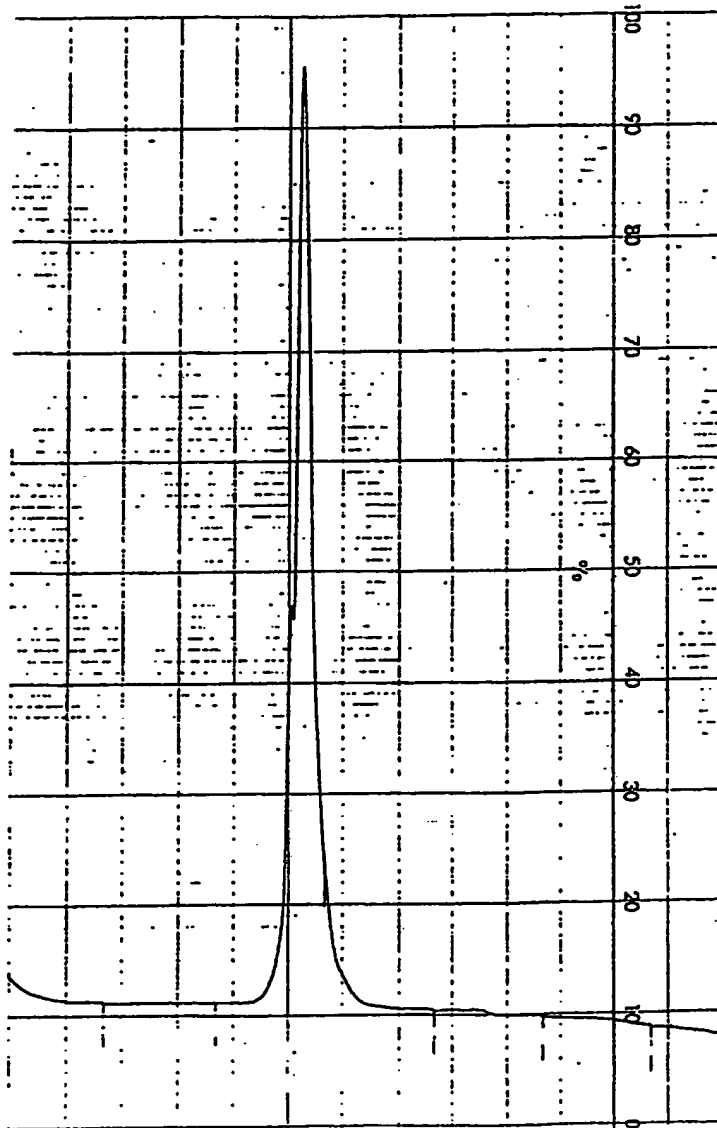


ERSATZBLATT

6/9

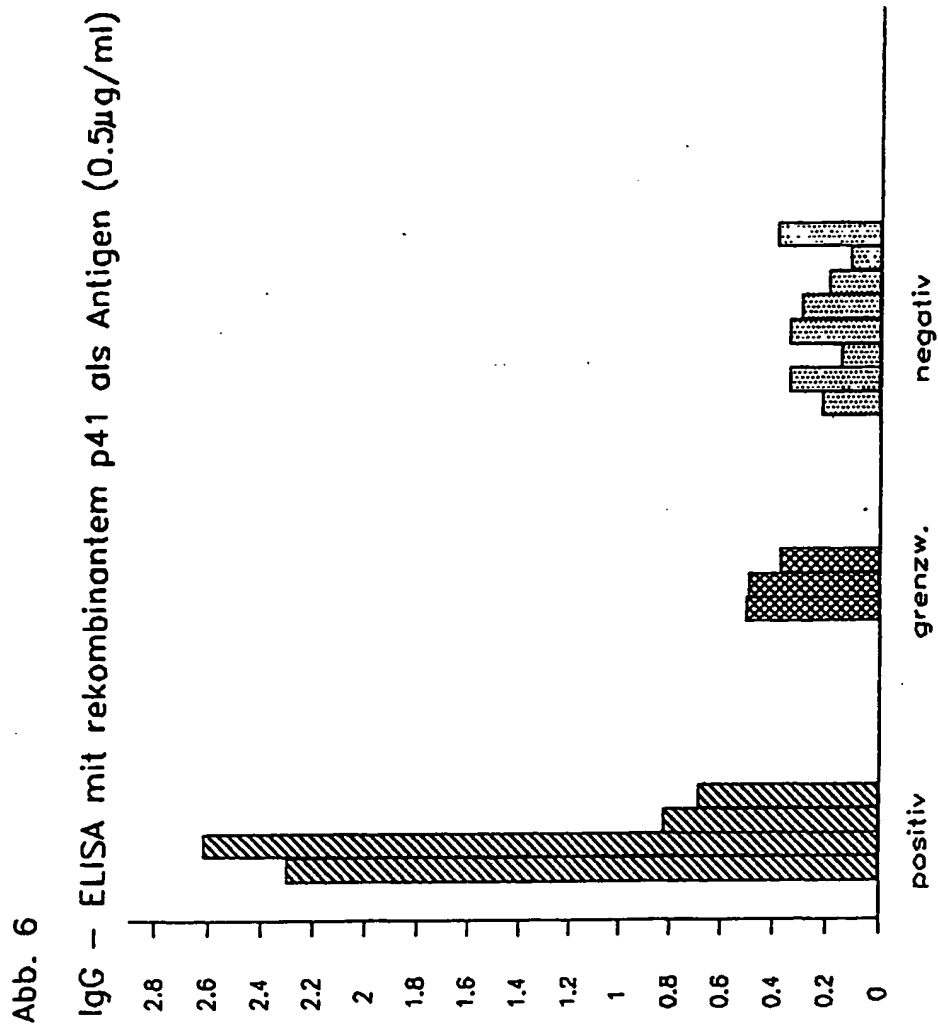
Abb.: 5

Elutionsprofil von p41 aus einer Ionenaustauscher-Säule



ERSATZBLATT

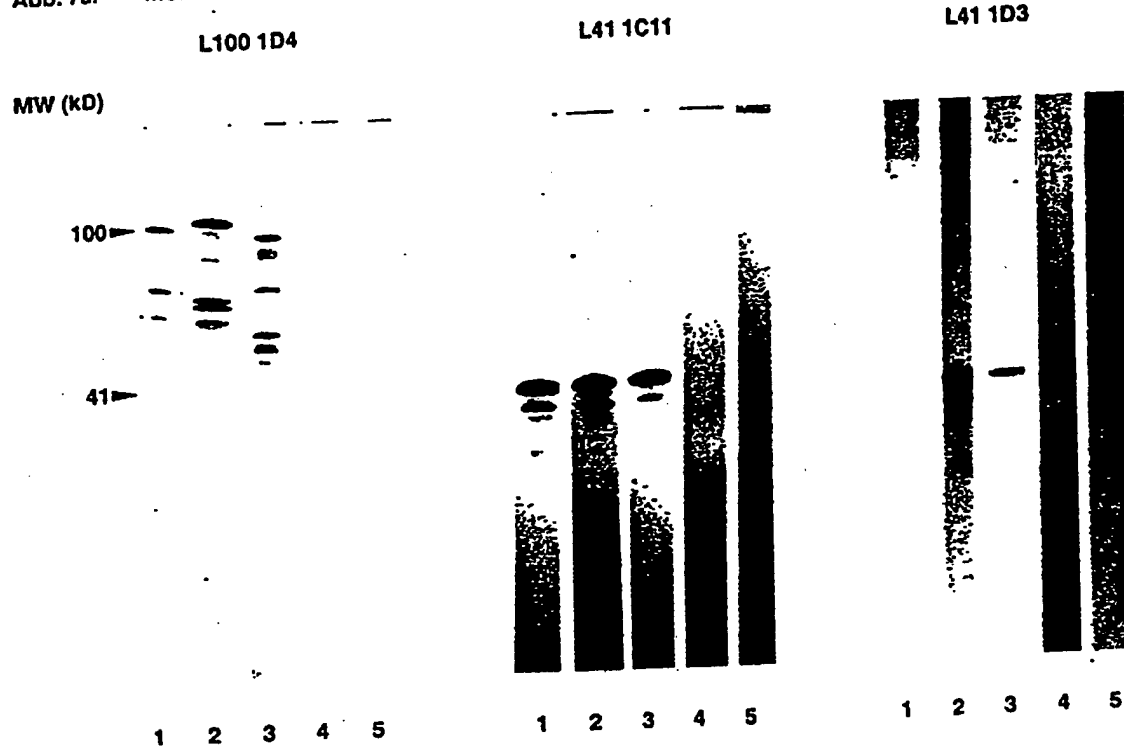
7/9



ERSATZBLATT

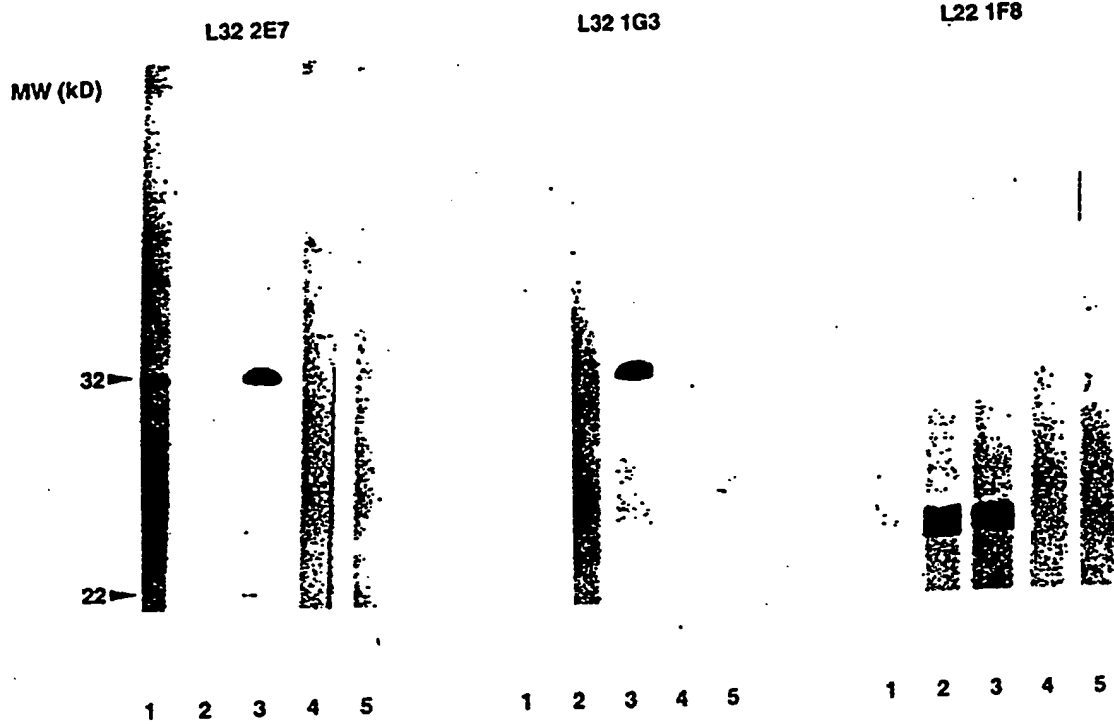
8/9

Abb. 7a: Monoklonale Antikörper gegen B. burgdorferi



ERSATZBLATT

9/9

Abb. 7b: Monoklonale Antikörper gegen *B. burgdorferi*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP90/02282

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int. Cl. ⁵ : C07K 13/00, C12N 15/31, G01N 33/569, A61K 39/02						
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Minimum Documentation Searched</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 20%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int. Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C07K, C12N, G01N</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in the fields searched *</div>			Classification System	Classification Symbols	Int. Cl. ⁵	C07K, C12N, G01N
Classification System	Classification Symbols					
Int. Cl. ⁵	C07K, C12N, G01N					
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *						
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³				
X	Nucleic Acids Research, Vol. 17, No. 9, 11 May 1989, IRL Press, Plc., G.S. Gassmann et al.: "Nucleotide sequence of a gene encoding the <i>Borrelia burgdorferi</i> flagellin", page 3590 see the whole document	1-7,9				
X	Nucleic Acids Research, Vol 17, No. 21, 11 November 1989, IRL Press, Plc., R. Wallich et al.: "Cloning and sequencing of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of a european <i>Borrelia</i> <i>burgdorferi</i> isolate", page 8864 see the whole document	1-4,7-9				
A	EP, A, 0252641 (MINNESOTA MINING AND MANUFACTU- RING COMPANY) 13 January 1988, see page 4, lines 9-52; page 5, lines 27 -32	14-22				
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁶</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p> </div> </div>						
IV. CERTIFICATION						
Date of the Actual Completion of the International Search 15 April 1991 (15.04.91)	Date of Mailing of this International Search Report 4 June 1991 (04.06.91)					
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer					

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P, A	Proc. Natl. Acad. Sci., vol 87, May 1990, U.E. Schaible et al.: "Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of <i>Borrelia burgdorferi</i> prevent lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice", pages 3768-3772 see the whole document	1, 5, 7, 9, 10, 12, 14- 22

EP 9002282
SA 43603

**This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 29/05/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0252641	13-01-88	US-A- 4888276	19-12-89

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 90/02282

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl. ⁵ C 07 K 13/00, C 12 N 15/31, G 01 N 33/569, A 61 K 39/02											
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 20%;">Klassifikationssystem</div> <div style="width: 80%;">Klassifikationssymbole</div> </div> Int.Cl. ⁵ C 07 K, C 12 N, G 01 N <div style="text-align: center; font-size: small; margin-top: 5px;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸</div>											
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 5%;">Art*</th> <th style="width: 75%;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%;">Betr. Anspruch Nr.¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;"> Nucleic Acids Research, Band 17, Nr. 9, 11. Mai 1989, IRL Press, Plc., G.S. Gassmann et al.: "Nucleotide sequence of a gene encoding the Borrelia burgdorferi flagellin", Seite 3590 siehe das ganze Dokument --- </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-7,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td style="vertical-align: top;"> Nucleic Acids Research, Band 17, Nr. 21, 11. November 1989, IRL Press, Plc., R. Wallich et al.: "Cloning and sequencing of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of a european Borrelia burgdorferi isolate", Seite 8864 siehe das ganze Dokument --- <div style="text-align: center;">./.</div> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-4,7-9</td> </tr> </tbody> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³	X	Nucleic Acids Research, Band 17, Nr. 9, 11. Mai 1989, IRL Press, Plc., G.S. Gassmann et al.: "Nucleotide sequence of a gene encoding the Borrelia burgdorferi flagellin", Seite 3590 siehe das ganze Dokument ---	1-7,9	X	Nucleic Acids Research, Band 17, Nr. 21, 11. November 1989, IRL Press, Plc., R. Wallich et al.: "Cloning and sequencing of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of a european Borrelia burgdorferi isolate", Seite 8864 siehe das ganze Dokument --- <div style="text-align: center;">./.</div>	1-4,7-9
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³									
X	Nucleic Acids Research, Band 17, Nr. 9, 11. Mai 1989, IRL Press, Plc., G.S. Gassmann et al.: "Nucleotide sequence of a gene encoding the Borrelia burgdorferi flagellin", Seite 3590 siehe das ganze Dokument ---	1-7,9									
X	Nucleic Acids Research, Band 17, Nr. 21, 11. November 1989, IRL Press, Plc., R. Wallich et al.: "Cloning and sequencing of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of a european Borrelia burgdorferi isolate", Seite 8864 siehe das ganze Dokument --- <div style="text-align: center;">./.</div>	1-4,7-9									
<div style="display: flex;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 55%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>											
IV. BESCHEINIGUNG <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">15. April 1991</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">04 JUN 1991</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> T. TAZELAAR </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">15. April 1991</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">04 JUN 1991</div>	Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> T. TAZELAAR </div>					
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">15. April 1991</div>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">04 JUN 1991</div>										
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> T. TAZELAAR </div>										

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>EP, A, 0252641 (MINNESOTA MINING AND MANUFACTURING COMPANY) 13. Januar 1988 siehe Seite 4, Zeilen 9-52; Seite 5, Zeilen 27-32</p> <p style="text-align: center;">---</p>	14-22
P,A	<p>Proc. Natl. Acad. Sci., Band 87, Mai 1990, U.E. Schaible et al.: "Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of Borrelia burgdorferi prevent lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice", Seiten 3768-3772 siehe das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,5,7,9, 10,12,14-22

EP 9002282
SA 43603

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 29/05/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0252641	13-01-88	US-A- 4888276	19-12-89

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.